

**Lokalisation des humanen Ionenkanals TRPM4 und seine
Bedeutung für Membranpotential und Ca²⁺-Signale**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
im Department Biologie der Fakultät
für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg

vorgelegt von

Ralf Fliegert

aus Reinbek/Schleswig-Holstein

2006

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. A. H. GUSE
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. L. RENWRANTZ
Tag der Disputation: 16. Dezember 2005

Hamburg, den 02. Dezember 2005



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Arno Frühwald'.

Professor Dr. Arno Frühwald
Dekan

Der experimentelle Teil der vorliegenden Dissertation am Fachbereich Biologie der Universität Hamburg wurde in der Zeit vom 15.02.2001 bis zum 17.08.2005 unter der Leitung von Herrn Prof. A.H. Guse (Fachbereich Medizin der Universität Hamburg) in der Arbeitsgruppe Calciumsignale des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie I: Zelluläre Signaltransduktion im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (Martinistraße 52, 20246 Hamburg) durchgeführt.

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. A.H. Guse
(Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie)

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. L. Renwranz
(Zoologisches Institut der Biologischen Fakultät)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Ionenkanäle	1
1.2	Bedeutung von Ionenkanälen in elektrisch nicht-erregbaren Zellen	2
1.2.1	Ca ²⁺ -Freisetzung und Ca ²⁺ -Einstrom	3
1.2.2	Modulation des Ca ²⁺ -Einstroms	4
1.3	Die Superfamilie der TRP-Kanäle	4
1.3.1	Entdeckung	4
1.3.2	TRP-Kanäle als Kandidaten für SOC	6
1.4	Die Familie der Melastatin-verwandten TRP-Kanäle (TRPM)	6
1.4.1	TRPM2	6
1.4.2	TRPM4	8
1.4.2.1	TRPM4a	9
1.4.2.2	TRPM4b	9
1.4.2.3	Spannungsabhängigkeit von TRPM4b	10
1.4.2.4	Vergleich von TRPM4b und TRPM5	11
1.4.2.5	TRPM4b und TRPM5 als CAN-Kanäle	11
1.4.2.6	Rolle von TRPM4b in elektrisch erregbaren Zellen	12
1.4.2.7	Rolle von TRPM4 in Lymphozyten	12
2	Problemstellung	14
3	Material & Methoden	15
3.1	Zellkultur	15
3.1.1	HEK-293-Zellen	15
3.1.2	COS-7-Zellen	15
3.1.3	CHO-Zellen	15
3.1.4	Jurkat-Zellen	16
3.1.5	Passage von Zellen	16
3.1.6	Kryokonservierung von adhärennten Zellen	16
3.1.7	Puffer und Lösungen	17
3.1.8	Geräte	17
3.2	Molekularbiologische Techniken	17

3.2.1	Präparation von Gesamt-RNA aus HEK-293-Zellen	17
3.2.2	One Tube RT-PCR	18
3.2.3	Restriktionsverdau von DNA	19
3.2.4	Agarosegelelektrophorese	19
3.2.5	Ligation von DNA-Fragmenten	19
3.2.6	Transformation von <i>E. coli</i> und Präparation von Plasmid-DNA	20
3.2.7	PCR-basierte Mutagenese	21
3.2.7.1	Modifizierte QuikChange-Mutagenese zur Reversion einer Punkt- mutation	21
3.2.7.2	Fusion-PCR zur Insertion von Exon 17	22
3.2.8	DNA-Sequenzierung	23
3.2.9	Transfektion eukaryotischer Zelllinien	23
3.2.10	Selektion und Klonierung stabiler Zelllinien	24
3.2.11	Verwendete Bakterien	24
3.2.12	Vektoren	25
3.2.13	Primer	25
3.2.14	Puffer und Lösungen	27
3.2.15	Geräte	28
3.3	Proteinbiochemische Techniken	28
3.3.1	Affinitätschromatographische Reinigung eines anti-Peptid-Antikörpers gegen TRPM4	28
3.3.2	Präparation von Membranfraktionen und Proteinbestimmung	29
3.3.3	Western-Blotting	29
3.3.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	29
3.3.3.2	Transfer der Proteine auf Nitrocellulose-Membranen	30
3.3.3.3	Immundetektion	30
3.3.4	Puffer & Lösungen	31
3.3.5	Geräte	31
3.4	Fluoreszenz-Mikroskopie	32
3.4.1	Geräte	33
3.5	Fluorimetrie	33
3.5.1	Ratiometrisch-fluorimetrische Bestimmung der intrazellulären Calcium- Konzentration mit Fura-2/AM	33
3.5.2	Ratiometrisch-fluorimetrische Bestimmung der Ca ²⁺ -Freisetzung aus permeabilisierten Zellen	34
3.5.3	Fluorimetrische Bestimmung von Veränderungen des Potentials der Plas- mamembran mit DiBAC4(3)	35
3.5.4	Puffer & Lösungen	35

3.5.5	Geräte	36
3.6	Elektrophysiologie	36
3.6.1	Patch-clamp-Technik	36
3.6.2	Messstand	37
3.6.3	Pipetten und Elektroden	37
3.6.4	Verstärker und Messtechnik	38
3.6.5	Ganzzellableitungen an HEK-293- und Jurkat-Zellen	39
3.6.6	Puffer & Lösungen	39
3.6.7	Geräte	40
4	Ergebnisse	41
4.1	Analyse der Expression von TRPM4 in HEK-293-Zellen	41
4.1.1	Klonierung der TRPM4a-cDNA aus HEK-293-Zellen	43
4.1.2	Konstruktion von Vektoren für die subzelluläre Lokalisation und funktionale Überexpression von TRPM4-Splicevarianten	45
4.2	Lokalisation von TRPM4-Splicevarianten durch Expression als EGFP-Fusionsprotein in eukaryotischen Zelllinien	48
4.2.1	TRPM4b ist in der Plasmamembran lokalisiert	48
4.2.2	TRPM4a und TRPM4c werden im Endomembransystem zurückgehalten	48
4.3	Funktionelle Überexpression von TRPM4 in HEK-293-Zellen	51
4.3.1	Generierung stabiler Zelllinien und Nachweis der Expression	51
4.3.2	Ca ²⁺ aktiviert transiente, nicht-selektive Kationenströme in TRPM4b überexprimierenden HEK-293-Zellen	53
4.3.3	Überexpression von TRPM4b führt zu einer Verstärkung des Ca ²⁺ -Einstroms nach Ionomycin	56
4.3.4	Überexpression von TRPM4b vermindert die pharmakologisch induzierte Depolarisation der Plasmamembran	57
4.3.5	Überexpression von TRPM4b vermindert die physiologisch induzierte Depolarisation der Plasmamembran	59
4.3.6	Überexpression von TRPM4a vergrößert den durch Rezeptorstimulation freigesetzten Anteil der intrazellulären Ca ²⁺ -Speicher	60
4.4	Aktivierung von endogenem TRPM2 in JMP T-Lymphozyten durch ADPR	64
4.4.1	Wirkung des NAD-Glykohydrolyase-Inhibitors 3GA sowie von 8-Br-ADPR auf die Aktivierung von TRPM2 durch ADPR	64
5	Diskussion	67
5.1	Expression von TRPM4-Splicevarianten	67
5.2	Subzelluläre Lokalisation von TRPM4-Splicevarianten	69
5.3	TRPM4b und die Regulation des Ca ²⁺ -Einstroms	71

5.4	TRPM4a und die Ca ²⁺ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern	74
5.5	Pharmakologische Modulation von TRPM2	77
6	Zusammenfassung	80
7	Abstract	82
8	Literaturverzeichnis	84
9	Anhang	99
9.1	Publikationen	99
9.2	Abstracts und/oder Posterpräsentationen	99
10	Danksagung	101

Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CCh	Carbachol
CDS	Proteinkodierende Sequenz (coding sequence)
cADPR	cyclische Adenosindiphosphatribose
Ca ²⁺	zweiwertige Calciumionen
[Ca ²⁺] _i	freie, cytoplasmatische Konzentration zweiwertiger Calciumionen
CaM	Calmodulin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Cys	Cystein
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECFP	verbessertes cyan fluoreszierendes Protein (enhanced cyan fluorescent protein)
EGFP	verbessertes grün fluoreszierendes Protein (enhanced green fluorescent protein)
EGTA	Ethylenglykol-(N,N,N',N')-tetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
FCS	foetales Kälberserum
fMLP	N-Formylmethionylleucylphenylalanin
Fura-2/AM	Acetoxymethoxyester des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein)
G-418	Geneticin-Sulfat
HeBS	HEPES-gepufferte Salzlösung (HEPES buffered salt solution)
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure

<i>I_{CRAC}</i>	Ca ²⁺ -release activated current
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IP3R	Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
mACh-Rezeptor	muskarinischer Acetylcholinrezeptor
MCS	Multiple cloning site
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger RNA)
NAADP	Nicotinsäureadeninindinukleotid-2'-phosphat
NAD	Nicotinamiddinucleotid
NADP	Nicotinamiddinucleotid-2'-phosphat
NCS	Serum neugeborener Kälber
OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster (open reading frame)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered salt solution)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PKC	Proteinkinase C
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (standard error of mean)
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase des sarkoplasmatischen/endoplasmatischen Retikulums (SR/ER)
SOC	Store operated channel
TAE	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
TE	Tris/EDTA-Puffer
TRP-Kanäle	'transient receptor potential'-Kanäle
TRPC	Unterfamilie der klassischen TRP-Kanäle (classical TRP channels)
TRPM	Melastatin Unterfamilie der TRP-Kanäle
TRPML	Mucolipin Unterfamilie der TRP-Kanäle
TRPP	Polycystin Unterfamilie der TRP-Kanäle
TRPV	Vanilloid-Rezeptor Unterfamilie der TRP-Kanäle
Tg	Thapsigargin
Tyr	Tyrosin

Ü/N	über Nacht
UTR	Untranslatierter Bereich
Upm	Umdrehungen pro Minute
wt	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Ionenkanäle

Die Untersuchung der Bedeutung der Elektrizität in biologischen Systemen begann mit den Versuchen von Galvani und Volta, die in der zweiten Hälfte des 18. Jahrhunderts zeigten, das man Froschschenkel mit Hilfe statischer Elektrizität zur Kontraktion bringen kann. Während des 19. Jahrhunderts verhinderte die geringe zeitliche Auflösung der zur Verfügung stehenden Drehspulen-Galvanometer die Messung der in tierischen Geweben auftretenden Ströme. Erst die Entwicklung von Oszilloskopen mit Kathodenstrahlröhren und von empfindlichen Verstärkern auf Basis von Elektronenröhren in den 20er Jahren des 20. Jahrhunderts schaffte die Voraussetzung, die Ströme einzelner Zellen zu messen (Übersicht in [Aidley und Stanfield, 1996](#)). Dies gelang 1939 erstmals Huxley und Hodgkin ([Hodgkin und Huxley, 1939](#)), sowie Curtis und Cole ([Curtis und Cole, 1942](#)) an den Riesenaxonen des Tintenfisches. Mit Hilfe der Spannungsklemme (Voltage-clamp) und unter Verwendung der 1949 eingeführten intrazellulären Glasmikroelektrode konnten [Hodgkin und Huxley \(1952\)](#) am Riesenaxon des Tintenfisches die am Aktionspotential beteiligten makroskopischen Ströme messen. Aufgrund von Fluktuationsanalysen der Ströme sowie Versuchen mit Ionophoren in künstlichen Lipid-Membranen wurde die Hypothese formuliert, daß diese Ionen durch Proteinporen in der Plasmamembran diffundieren. Mit der von ihnen entwickelten Patch-clamp-Methode gelang es [Neher und Sakmann \(1976\)](#) das erste Mal, den Strom durch einzelne Acetylcholin(ACh)-aktivierte Ionenkanäle im Froschmuskel direkt zu messen.

Die Empfindlichkeit der verwendeten Meßmethoden beschränkte ihre Anwendung zunächst auf wenige Modellsysteme, in der Regel elektrisch erregbarer Zellen, wie das Riesenaxon des Tintenfisches oder die motorische Endplatte im Froschmuskel. Erst die Entwicklung empfindlicher fluorimetrischer Methoden zur Bestimmung intrazellulärer Ionen ([Tsien et al., 1982](#)) und der Gigaseal-Patch-clamp-Methode ([Hamill et al., 1981](#)) erlaubten auch, sehr viel kleinere Ströme, sowie Veränderungen des Potentials und der Ionenkonzentrationen in nicht-erregbaren Zellen zu untersuchen.

Ionenkanäle sind neben membranständigen Rezeptoren besonders geeignete Ziele für Pharmaka. Anders als bei Modulatoren intrazellulärer Enzyme muß das Pharmakon die Zellmembran nicht durchqueren, wenn es an die extrazelluläre Seite des Kanals bindet. Modulatoren von Ionenkanälen erregbarer Zellen sind als therapeutisch eingesetzte Pharmaka bereits sehr erfolgreich. Calcium-Kanal-Inhibitoren als Antihypertensiva, Anxiolytika, die den Cl^- -Strom

in Neuronen verstärken und K^+ -Kanal-Blocker, die zu Insulin-Freisetzung beitragen sind nur einige Beispiele für erfolgreich zur Therapie eingesetzte Ionenkanalmodulatoren.

Die Entdeckung, daß Ionenkanäle auch in Signaltransduktion und Funktion nicht-erregbarer Zellen eine entscheidende Rolle spielen, hat dazu geführt, daß Modulatoren von Ionenkanälen nicht nur für klassische Felder wie Herz-Kreislaufkrankungen und zentrales Nervensystem in Betracht gezogen werden, sondern, daß auch nach Anwendungen in der Modulation des Immunsystems und zur Therapie von Krebs und anderen Erkrankungen gesucht wird (Xie et al., 2004; Li et al., 2004).

1.2 Bedeutung von Ionenkanälen in elektrisch nicht-erregbaren Zellen

Ein wesentliches Merkmal elektrisch erregbarer Zellen ist ihre Fähigkeit bei elektrischer Stimulation, d.h. lokaler Depolarisation der Plasmamembran, mit einer ausgeprägten elektrischen Antwort zu reagieren. Aufgrund der Expression von spannungsabhängigen Ionenkanälen breitet sich diese in einer Art Welle über die gesamte Zelle aus und mündet letztlich in der Aktivierung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen und damit im Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle. Der Anstieg in der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration vermittelt dann die Effekte des elektrischen Signals auf die Zelle, in dem es direkt oder indirekt Enzymaktivitäten moduliert, die Genexpression verändert, Vesikeltransport und -fusion induziert oder Zellmotilität und Cytoskelett beeinflusst (Berridge et al., 2000).

Das wesentliche Unterscheidungsmerkmal von elektrisch nicht-erregbaren gegenüber elektrisch erregbaren Zellen ist das Fehlen spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle (Barritt, 1999). Eine Depolarisation der Membran elektrisch nicht-erregbarer Zellen führt somit nicht zu einer Erhöhung der cytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration. Da praktisch jeder zelluläre Vorgang auf direkte oder indirekte Weise durch Ca^{2+} moduliert wird, nutzen jedoch auch elektrisch nicht-erregbare Zellen die Veränderung der cytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration für ihre Signaltransduktion (Berridge, 1993). Die stimulationsabhängige Veränderung der cytoplasmatischen, freien Ca^{2+} -Konzentration erfolgt in nicht-erregbaren Zellen jedoch nicht durch Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle.

In nicht-erregbaren Zellen führt Stimulation, z.B. mit einem Hormon oder Wachstumsfaktor, zur Aktivierung einer Vielzahl unterschiedlicher Signaltransduktionswege (Übersicht in Gomperts et al., 2003). U.a. wird das Enzym Phospholipase C aktiviert, das das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (Ins-1,4,5-P₃) und Diacylglycerol (DAG) spaltet (Kirk et al., 1981). Während der Lipidrest Diacylglycerol in der Membran bleibt und an der Aktivierung der Proteinkinase C beteiligt ist (Kishimoto et al., 1980), gelangt wasserlösliches Ins-1,4,5-P₃ durch Diffusion im Cytosol zu seinem tetrameren Rezeptor in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (Furuichi et al.,

1989; Yamamoto et al., 1991). Dieser Rezeptor ist gleichzeitig ein Ionenkanal, der bei Bindung von Ins-1,4,5-P₃ die Freisetzung von Ca²⁺ aus dem ER vermittelt (Streb et al., 1983). Die Freisetzung des Ca²⁺ aus dem ER erfolgt entlang eines Konzentrationsgradienten. Ca²⁺-ATPasen des SR/ER (SERCA) sorgen im unstimulierten Zustand für eine im Vergleich zum Cytoplasma hohe intraluminale Ca²⁺-Konzentration im ER (MacLennan et al., 1985).

Der Ryanodin-Rezeptor, ein weiterer Ionenkanal in intrazellulären Speichern, wird in einem als CICR (Calcium induced Calcium release) bezeichneten Prozess durch die Erhöhung der cytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration aktiviert und mediiert ebenfalls die Freisetzung von Ca²⁺ aus dem Endomembran-System der Zelle (Rich und Langer, 1975; Pessah et al., 1985). Die Freisetzung von Ca²⁺ über den Ryanodin-Rezeptor wird durch die Nukleotid-Botenstoffe cADPR (Galione et al., 1991; Meszaros et al., 1993) und NAADP (Hohenegger et al., 2002; Langhorst et al., 2004; Dammermann und Guse, 2005) induziert bzw. moduliert. Eine Beteiligung der Ektoenzyme CD38 (Lee und Aarhus, 1991) und CD157 (Adebanjo et al., 2000), den einzigen bekannten Enzymen mit ADP-Ribosylcyclase-Aktivität in Wirbeltieren, an der Bildung dieser Botenstoffe wird diskutiert. Das sogenannte topologische Paradoxon, daß das aktive Zentrum dieser Enzyme und damit der putative Bildungsort der Botenstoffe auf der Außenseite der Membran liegt, während der Wirkort sich in der Zelle befindet (De Flora et al., 1997), läßt vermuten, daß es weitere, cytosolische Enzyme gibt. Auf welchem Wege cADPR und NAADP gebildet bzw. metabolisiert werden, ist trotz intensiver Bemühungen bis heute nicht endgültig geklärt.

1.2.1 Ca²⁺-Freisetzung und Ca²⁺-Einstrom

Die Menge an Ca²⁺ in den intrazellulären Speichern ist limitiert (Meldolesi und Pozzan, 1998). Verfolgt man die Veränderung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration mit dem fluorimetrischen Ca²⁺-Indikator Fura-2, so führt die Ca²⁺-Freisetzung aus dem ER in Abwesenheit von extrazellulärem Ca²⁺ zu einem transienten Ca²⁺-Signal. Das freigesetzte Ca²⁺ wird rasch wieder in zelluläre Kompartimente aufgenommen und die cytoplasmatische Ca²⁺-Konzentration geht auf den Ruhewert zurück. Im Gegensatz dazu kommt es in Gegenwart von extrazellulärem Ca²⁺ bei vielen Zelltypen zu einem biphasischen Signal mit einem initialen Peak, gefolgt von einem Plateau erhöhter Ca²⁺-Konzentration, das solange bestehen bleibt, wie der Stimulus präsent ist. Die zweite Phase des Signals ist durch Freisetzung aus intrazellulären Speichern allein nicht zu erklären (Übersicht in Putney und Ribeiro, 2000). Dies führte zur Hypothese des kapazitativen Ca²⁺-Einstroms (CCE): die Verringerung der luminalen Ca²⁺-Konzentration intrazellulärer Speicher führt zur Aktivierung von Ca²⁺-Kanälen in der Membran (Putney, 1986). Die Hypothese konnten Takemura et al. (1989) bestätigen, in dem sie zeigten, daß pharmakologische Inhibition der SERCA mit Thapsigargin zu passiver Depletion der Ca²⁺-Speicher führt und dadurch einen Ca²⁺-Einstrom aktiviert.

Neben einem elektrophysiologisch gut charakterisierten, einwärtsgerichteten Strom mit

hoher Ca^{2+} -Selektivität (I_{CRAC}) in einer Mastzelllinie (Hoth und Penner, 1992) und in Jurkat T-Lymphozyten (Zweifach und Lewis, 1993) wurden auch Speicher-abhängige Kanäle/Ströme mit geringerer Selektivität für Ca^{2+} beschrieben, die zusammengefasst als 'Store operated channels / currents' (SOC) bezeichnet werden. Die molekulare Basis dieses Phänomens ist bis heute ungeklärt. Trotz verschiedener Kandidaten ist der bzw. sind die beteiligten Ionenkanäle nicht identifiziert. Genauso unklar ist der Mechanismus ihrer Aktivierung (Übersicht in Penner und Fleig, 2004; Parekh und Putney, 2005).

1.2.2 Modulation des Ca^{2+} -Einstroms

Der elektrochemische Antrieb, der neben der Leitfähigkeit (Gesamtheit der Ca^{2+} -permeablen Kanäle in der Membran der Zelle) die Höhe des Ca^{2+} -Stroms bestimmt, hängt (i) vom Konzentrationsgradienten und (ii) vom Membranpotential ab. Damit bestimmt das Membranpotential entscheidend, wieviel Ca^{2+} durch die geöffneten Kanäle in die Zelle gelangt. Darüber hinaus führt die Ladungstrennung bei fortgesetztem Ca^{2+} -Einstrom ohne Ausgleich zur Depolarisation der Membran. Der elektrochemische Antrieb für Ca^{2+} nimmt aufgrund der Depolarisation ab und der Transport von Ca^{2+} aus der Zelle wird erleichtert.

Veränderungen des Membranpotentials sind also ein Weg der Zelle den Ca^{2+} -Einstrom zu modulieren. Besonders intensiv untersucht wurden diese komplexen Regulationsmechanismen an Lymphozyten (Übersicht in Krasznai, 2005), bei denen u.a. Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanäle (Fanger et al., 2001) und spannungsabhängige K^+ -Kanäle (K_V -Kanäle, Wulff et al., 2003) an der Kompensation der mit dem Ca^{2+} -Einstrom verbundenen Depolarisation beteiligt sind. Der Ausstrom von K^+ durch diese Kanäle repolarisiert die Membran und ist damit Voraussetzung für die in Lymphozyten für die Proliferation notwendige, langanhaltende Erhöhung der cytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration.

1.3 Die Superfamilie der TRP-Kanäle

1.3.1 Entdeckung

Im Gegensatz zur Sehkaskade der Wirbeltiere, bei dem Transducin eine cGMP-spezifische Phosphodiesterase aktiviert, ist das Zielproteine für das lichtaktiviertes Rhodopsin stimulierte G-Protein in Wirbellosen eine Phospholipase $C\beta$ (*NorpA*, Bloomquist et al., 1988). Während in den Stäbchen des Wirbeltierauges die Abnahme der cGMP-Konzentration nach Belichtung dazu führt, daß ein im Dunkeln offener CNG-Kanal ('cyclic nucleotide gated', Dunkelstrom) schließt, und die Membran hyperpolarisiert, führt Belichtung im Komplexauge zur Öffnung eines Kanals und damit zur Depolarisation der Membran (Hardie und Raghu, 2001). Das Komplexauge der Drosophila Mutante *trp* ist im Gegensatz zum Wildtyp nicht in der Lage bei Belichtung ein dauerhaftes Signal zu generieren. Das Rezeptorpotential ist transient, folglich die Bezeichnung 'transient receptor potential' (Cosens und Manning, 1969).

Die *trp*-defizienten Fliegen werden durch intensives Licht geblendet, da der langanhaltende Ca^{2+} -Einstrom und damit die Adaptation ausbleiben. Obwohl diese Mutante bereits seit 1969 bekannt ist, wurde das Gen erst 1989 von Montell und Rubin kloniert (Montell und Rubin, 1989). Das von *trp* kodierte Protein weist acht hydrophobe Segmente auf. Hardie und Minke (1992) haben gezeigt, daß es sich bei Trp um einen (indirekt) durch Licht aktivierten Ca^{2+} -permeablen Ionenkanal handelt. Unabhängig davon wurde ein CaM-bindendes Protein aus dem Kopf-Bereich von *Drosophila* isoliert (Trp-like = Trpl), das eine hohe Homologie zu Trp aufwies und bei dem es sich ebenfalls um einen Ionenkanal handelt (Phillips et al., 1992). Im Gegensatz zu Trp handelt es sich bei Trpl um einen nicht-selektiven Kationenkanal. Während Trp für die langanhaltende Depolarisation bei Dauerbelichtung verantwortlich ist, vermittelt Trpl die initiale Depolarisation, die im Elektroretinogramm der *trp*-Mutante beobachtet werden kann. Die Doppelmutation *trp* und *trpl* zeigt keine elektrische Antwort auf Belichtung mehr (Niemeyer et al., 1996). Sowohl Trp als auch Trpl sind homolog zu spannungsabhängigen Na^{+} - und Ca^{2+} -Kanälen, ihnen fehlt jedoch die für die Spannungsregulation notwendigen positiv geladenen Aminosäuren in der Transmembranhelix S4.

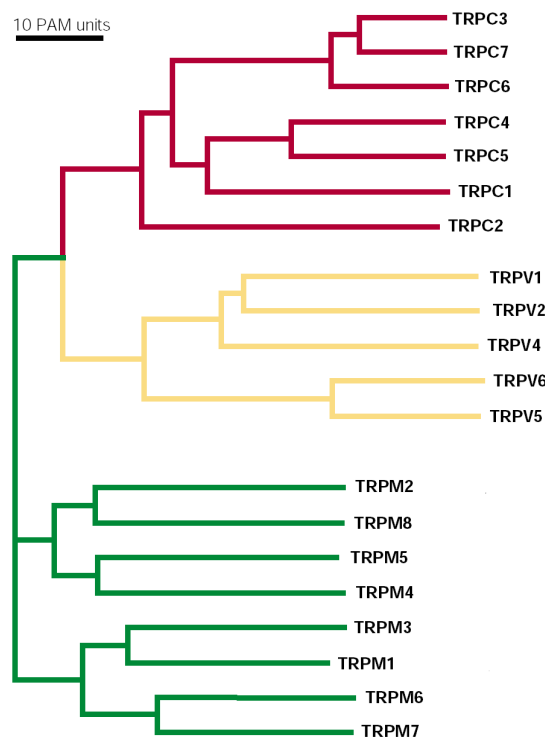


Abbildung 1.1: Phylogenetische Verwandtschaft der Mitglieder der drei Hauptfamilien der Superfamilie der TRP-Kanäle. Der Abstand zu den Verzweigungspunkten gibt den Grad der evolutionären Verwandtschaft an. Verändert nach Clapham et al. (2001).

1.3.2 TRP-Kanäle als Kandidaten für SOC

Seit der Entdeckung, daß der rekombinant in Sf9-Zellen (Vaca et al., 1994) oder in Xenopus Oozyten (Petersen et al., 1995) exprimierte Trp-Kanal durch Thapsigargin aktivierbar ist, gelten Trp-Kanäle als Kandidaten für die Rolle des durch Depletion der Ca^{2+} -Speicher gesteuerten Kanals (SOC). Insbesondere hat diese Entdeckung die Suche nach Wirbeltier-Orthologen stimuliert. Mittlerweile sind 28 Mitglieder der TRP-Superfamilie beschrieben worden (Clapham et al., 2001). Diese wird nach neuer Nomenklatur der International Union of Pharmacology (Clapham et al., 2003) in drei Hauptfamilien unterteilt: die Familie der klassischen TRP-Kanäle (TRPC), die Familie der Vanilloid-Rezeptor-verwandten TRP-Kanäle (TRPV) und die Familie der Melastatin-verwandten TRP-Kanäle (TRPM). Neben diesen Hauptfamilien gibt es noch drei weitere: die Familie der Mucolipine (TRPML), die Familie der Polycystine (TRPP) und ANKTM-1 (TRPA).

1.4 Die Familie der Melastatin-verwandten TRP-Kanäle (TRPM)

Die Familie der Melastatin-verwandten TRP-Kanäle umfasst mittlerweile acht Mitglieder, die aufgrund ihrer Homologie in vier Subfamilien unterteilt werden können. Aufgrund im Vergleich zu den anderen TRP-Kanal-Familien langer N- und C-Termini wurden die TRPM-Kanäle vor der Reform der Nomenklatur auch als LTRPC (long TRP channels) bezeichnet. An den N-Terminus schließt sich ein zentraler Bereich mit sechs Transmembran-Domänen (S1-S6) und einer hydrophoben Schlaufe zwischen den Transmembranhelices S5 und S6 an, die die Pore bildet. Auf diesen Bereich folgt ein Bereich mit Coiled-Coil-Struktur und ein langer C-Terminus, der an der Aktivierung beteiligt zu sein scheint (Fleig und Penner, 2004b,a; Harteneck, 2005; Kraft und Harteneck, 2005).

Die einzelnen Mitglieder der TRPM-Familie unterscheiden sich deutlich hinsichtlich ihrer Ionenselektivität und ihres Aktivierungsmodus. Der namensgebende TRPM1 (Melastatin), der als Tumorsuppressor wirkt und in metastasierenden Melanomen herunterreguliert ist, ist bislang kaum charakterisiert (Xu et al., 2001). Das am besten charakterisierte Mitglied der Familie ist TRPM8, der Rezeptor für Menthol, der auch in Zusammenhang mit der Empfindung von Kälte gebracht wird (McKemy et al., 2002). TRPM6 und TRPM7, die aufgrund ihrer Proteinkinase-Domäne auch als 'Channel-Kinasen' bezeichnet werden, sind an der zellulären Mg^{2+} -Homeostase beteiligt (Chubanov et al., 2005; Schmitz et al., 2003). TRPM3 wird durch osmotischen Stress und Sphingosin aktiviert (Grimm et al., 2003, 2005)

1.4.1 TRPM2

TRPM2 weist im C-Terminus eine Domäne mit Homologie zu NUDT9, einer 350 Aminosäuren langen, mitochondrialen ADPR-Pyrophosphatase, auf (Perraud et al., 2001). Die TRPM-Kanäle TRPM6, TRPM7 und TRPM2 werden ihrer Enzym-Domänen wegen als Chanzymes

(‘Channel’ + ‘Enzymes’) bezeichnet (Montell, 2003; Scharenberg, 2005). Im Gegensatz zu NUDT9 besitzt TRPM2 jedoch nur geringe ADPR-Pyrophosphatase-Aktivität.

Die Expression endogener TRPM2-Transkripte kann in vielen Geweben und Zelllinien nachgewiesen werden. Analyse mittels RT-PCR ergab, daß es sich bei TRPM2 um den in peripherem Blut und in Zelllinien leukozytären Ursprungs am höchsten exprimierten Kanal der TRPM-Familie handelt (Sano et al., 2001; Heiner et al., 2003).

Die Patch-clamp-Analyse TRPM2 überexprimierender HEK-293-Zellen hat gezeigt, daß es sich bei TRPM2 um einen nicht-selektiven, Ca^{2+} -permeablen Kationenkanal handelt, dessen Offenwahrscheinlichkeit durch freie ADP-Ribose beeinflusst wird ($\text{EC}_{50} = 90 \mu\text{M}$, ohne freies Ca^{2+} , Perraud et al. (2001)). In U937-Zellen, in denen die endogene Expression von TRPM2 mittels RT-PCR nachgewiesen wurde, aktiviert die Infusion von ADPR über die Patch-Pipette große Kationenströme, die denen TRPM2-überexprimierender Zellen ähneln (Sano et al., 2001). Sano et al. (2001) konnten zeigen, daß neben ADPR auch β -NAD, wenngleich mit langsamerer Kinetik, TRPM2 aktivieren kann. Ob β -NAD dabei zu ADPR metabolisiert wird, oder es sich um eine direkte Wirkung von β -NAD auf TRPM2 handelt, wird kontrovers diskutiert. Die Sensitivität von TRPM2 gegenüber ADPR wird durch die freie cytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration reguliert, so daß bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen nur ein geringer Anstieg der ADPR-Konzentration zur Aktivierung von TRPM2 nötig ist (McHugh et al., 2003). Da TRPM2 selbst zur Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration beiträgt, handelt es sich bei dieser Regulation um eine positive Rückkopplungsschleife.

TRPM2 wird durch mikromolare Mengen an Wasserstoffperoxid und durch andere Reagenzien, die reaktive Sauerstoff-(ROS) oder Stickstoffspezies (RNS) bilden, aktiviert (Hara et al., 2002). Ob es sich dabei um eine direkte Modifikation des Kanals durch diese Reagenzien oder um einen durch ADPR/ β -NAD vermittelten Effekt handelt ist unklar. Für eine Beteiligung von β -NAD spricht, daß das NAD/NADH-Verhältnis bei oxidativem Stress zunimmt und, daß TRPM2-Aktivierung durch ROS nur in Patch-Konfigurationen beobachtet werden konnte, die die zelluläre Integrität weitgehend bewahren (Hara et al., 2002). Die Isolierung einer TRPM2-Splicevariante, der die C-terminale ADPR-Bindungsstelle fehlt und die bei Expression in HEK-293-Zellen zwar noch durch Wasserstoffperoxid, nicht jedoch durch Infusion von ADPR aktiviert werden konnte, spricht hingegen gegen eine Beteiligung von β -NAD oder ADPR (Wehage et al., 2002).

Kolisek et al. (2005) haben gezeigt, daß neben ADPR auch die zyklische Verbindung cADPR TRPM2 zu aktivieren vermag. Während die durch cADPR- und Wasserstoffperoxid-vermittelte Aktivierung durch 8-Br-cADPR inhibiert werden kann, inhibiert 8-Br-cADPR die Aktivierung von TRPM2 durch ADPR nicht (Kolisek et al., 2005). Da auch die zelluläre cADPR-Konzentration nach Behandlung von Zellen mit ROS zunimmt (Okabe et al., 2000; Xie et al., 2003), ist es möglich, daß die von Wehage et al. (2002) beobachtete Aktivierung der $\Delta 27$ -Splicevariante auf die Wirkung von cADPR zurückzuführen ist.

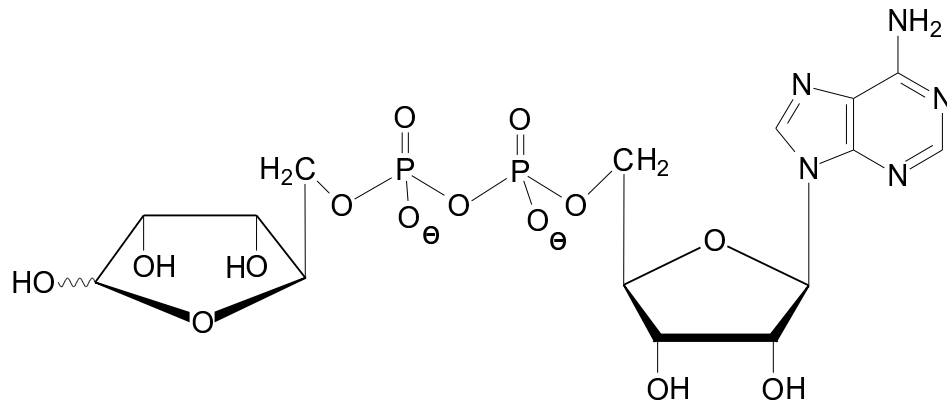


Abbildung 1.2: Struktur des TRPM2-Agonisten und möglichen sekundären Botenstoffs Adenosindiphosphoribose (ADPR). ADPR wird durch Hydrolyse der N-glykosidischen Bindung zwischen Nicotinamid und Ribose aus β -NAD gebildet.

Die Regulation von TRPM2 durch ADPR legt die Vermutung nahe, daß es sich bei ADPR um einen sekundären Botenstoff handelt, dessen Bildung und Metabolisierung an der Regulation des Ca^{2+} -Einstroms in TRPM2 exprimierenden Zellen beteiligt ist. Erster Schritt zum Test dieser Hypothese ist, zu bestimmen, ob die zelluläre ADPR-Konzentration sich unter Bedingungen verändert, die zu einer Aktivierung von TRPM2 führen. Eine geeignete HPLC-Methodik zur Bestimmung zellulärer ADPR-Konzentrationen ist bereits verfügbar ([Gasser und Guse, 2005](#)). Darüber hinaus ist die Etablierung von Pharmaka zur Interferenz mit diesem Signalsystem notwendig. Diese Pharmaka müssen hinsichtlich ihrer Spezifität untersucht werden. Mit diesen Substanzen kann dann, in Ergänzung molekulargenetischer Methoden, die Beteiligung eines möglichen ADPR/TRPM2-Systems an physiologischen Prozessen untersucht werden.

1.4.2 TRPM4

Eine als FLJ20041 bezeichnete TRPM4-cDNA wurde 2001 im Rahmen des japanischen cDNA-Sequenzierungsprojekts NEDO aus Gewebe kloniert (Genbank gi:7019878, [Yudate et al., 2001](#)). Das längste offene Leseraster dieser cDNA kodierte für ein Protein mit 30-40% Homologie zur TRPM-Familie. Mittels Durchmusterung von cDNA-Banken aus Placenta, Hirn und Hoden mit einem TRPM1-homologen EST-Klon gelang [Xu et al. \(2001\)](#) die Klonierung einer 4.0 kb langen cDNA mit einem offenen Leseraster von 1040 Aminosäuren. [Launay et al. \(2002\)](#) haben kurz darauf mit einem TRPM2-EST aus cDNA-Banken aus Milz, einer Prostata-Adenokarzinoma-Linie und foetaler Niere eine 4.1 kb-große cDNA isoliert, die ein offenes Leseraster mit 1214 Aminosäuren aufweist. Die beiden Transkripte sind alternative Splice-produkte des humanen TRPM4-Gens, das auf Chromosome 19q13.32 liegt ([Xu et al., 2001](#)). Zwei menschliche Erbkrankheiten sind an diesen Locus gekoppelt: orofacial cleft-3 ([Stein](#)

et al., 1995) und autosomal dominant spastic paraplegia (Reid et al., 2000). Das kürzere Transkript, das für TRPM4a kodiert, entsteht durch Initiation der Transkription an einer alternativen Start-Stelle und Deletion des dritten und vierten Exons aus dem Primärtranskript durch Splicing. Als Folge davon liegt im TRPM4a-Transkript das erste im Leseraster befindliche Startcodon im Exon 5 und TRPM4a ist um 174 aminoterminalen Aminosäuren gegenüber TRPM4b, dem Produkt des längeren Transkripts, verkürzt.

Northern-Blot-Analyse zeigt die Expression von TRPM4-Transkripten in allen bislang untersuchten Zelllinien, sowie in den meisten adulten Geweben, mit der höchsten Expression in Herz, Prostata und Colon (Xu et al., 2001; Launay et al., 2002; Nilius et al., 2003). Primäre Leukozyten exprimieren im Gegensatz zu entsprechenden Zelllinien (Ramos, Jurkat, U937 und Ku812) kein TRPM4-Transkript (Xu et al., 2001; Nilius et al., 2003). Zusätzlich zu den beiden etwa 4 kb langen Transkripten konnte ein Hoden-spezifisches, kurzes Transkript von 2.4 kb nachgewiesen werden (Xu et al., 2001). Mit einem polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen ein Peptid aus TRPM4 gelang Launay et al. (2004) der Nachweis der endogenen Expression des Proteins in der Zelllinie HEK-293 und den menschlichen T-Zelllinien Molt-4 und Jurkat.

1.4.2.1 TRPM4a

Ca²⁺-Imaging von HEK-293-Zellen mit transienter TRPM4a-Überexpression, zeigt eine erhöhte Ca²⁺-Konzentration im unstimulierten Zustand; Entzug des extrazellulären Ca²⁺ führt zu einer schnellen Abnahme der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration, die bei erneuter Zugabe von Ca²⁺ über den Basalwert anstieg. Die Lanthanoide La³⁺ oder Gd³⁺ (80 μ M) inhibieren den Ca²⁺-Einstrom (Xu et al., 2001). Xu und Mitarbeiter schlossen daraus, daß es sich bei TRPM4a um einen konstitutiv offenen Ca²⁺-Kanal handelt, der in Analogie zu TRPM1 durch Interaktion mit einer nicht membranständigen, verkürzten Form reguliert wird, die den Kanal in der Zelle retardiert (Xu et al., 2001). Anders als für TRPM4b konnten für TRPM4a in überexprimierenden HEK-293-Zellen im 'whole cell'-Experiment keine Histamin-aktivierten Ströme gemessen werden (Hofmann et al., 2003).

1.4.2.2 TRPM4b

Obwohl sich TRPM4a und TRPM4b in ihrer Poren-Region nicht unterscheiden ist die längere Form TRPM4b nicht permeabel für Ca²⁺. TRPM4b ist ein unspezifischer Kationenkanal, der Na⁺, K⁺ und Cs⁺ jedoch kein Ca²⁺ leitet und eine Einzelkanal-Leitfähigkeit von 25 pS aufweist. Patch-clamp-Experimente mit TRPM4b überexprimierenden HEK-293-Zellen im 'whole cell'-Modus haben gezeigt, das TRPM4b nicht konstitutiv geöffnet ist, sondern durch Ca²⁺ aktiviert wird. TRPM4b ist damit der erste TRP-Kanal für den eine direkte Regulation durch Ca²⁺ beschrieben wurde. Indirekte Mechanismen der Aktivierung durch Ca²⁺-abhängige Signalwege konnten in zellfreien exzidierten 'inside-out'-Patch-clamp-Experimenten

ausgeschlossen werden (Launay et al., 2002). Die Wirkung von Ca^{2+} auf TRPM4b wird durch Calmodulin vermittelt. TRPM4b besitzt fünf Calmodulin-Bindungsstellen. Deletion jeder einzelnen von drei C-terminalen CaM-Bindungsstellen führt zu einer starken Verminderung der Ca^{2+} -Sensitivität (Nilius et al., 2005a). Unterschiedliche Labors veröffentlichten unterschiedliche Dosis-Wirkungs-Beziehungen für die Aktivierung durch Ca^{2+} . Während von Launay et al. (2002) eine EC_{50} von 400 nM mit einer Sättigung bei 1 μM bestimmt wurde (später korrigiert: $\text{EC}_{50}=880$ nM, Prawitt et al. (2003)), konnten Nilius et al. (2003) keine Sättigung beobachten, der Strom nahm auch bei 5 mM Ca^{2+} immer noch zu. Während Launay et al. (2002) zunächst eine langsame, langanhaltende Aktivierung von TRPM4b durch Ca^{2+} beschrieben haben, konnten Nilius et al. (2003) zeigen, daß Ca^{2+} TRPM4b nicht nur aktiviert, sondern eine hohe Ca^{2+} -Konzentration auf der cytoplasmatischen Seite zu Desensitivierung führt. Die Folge ist eine transiente Aktivierung von TRPM4b bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen.

ATP, ADP, AMP, AMP-PNP (nicht-hydrolysierbare ATP-analoge Verbindung) und Adenosin inhibieren im exzidierten 'inside-out'-Patch TRPM4b schnell und reversibel, andere Nukleotide, wie GTP, CTP und UTP haben hingegen keine Wirkung. Der Block durch ATP wird durch Mg^{2+} in der Badlösung nicht beeinflusst. Die IC_{50} für ATP^{4-} und ADP liegt bei 2 μM (Nilius et al., 2004b). Diesen Beobachtungen im zellfreien System stehen Messungen im 'whole cell'-Mode gegenüber, bei denen TRPM4b in Gegenwart von freien, cytosolischen ATP-Konzentrationen von über 100 μM aktiviert werden kann. Diese paradoxe Wirkung von ATP kann nur erklärt werden, wenn man annimmt, daß ATP sowohl aktivierend als auch inhibierend auf TRPM4b wirkt (Nilius et al., 2005a).

Spermin, ein Polyamin, blockiert die Pore von TRPM4b durch Interaktion mit Glu- und Asp-Resten, die die Pore flankieren. Die IC_{50} beträgt 60 μM (Nilius et al., 2004b).

PKC-Phosphorylierung an den Ser-Resten 1145 und 1152 senkt den EC_{50} für die Aktivierung durch Ca^{2+} von 15 μM auf 4 μM (Nilius et al., 2005a). Ein sensitivierender Effekt der PKC-Aktivierung auf endogene, TRPM4b-ähnliche Ströme ist durch Guinamard et al. (2004) beschrieben worden.

Launay et al. (2002) schlagen auf Basis ihrer Ergebnisse ein Modell vor in dem TRPM4b Teil eines regulatorischen Systems ist, das den Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran kontrolliert. In nicht erregbaren Zellen kommt es in Folge Rezeptor-vermittelter Ca^{2+} -Freisetzung zum Einstrom von Ca^{2+} durch SOC. Die Erhöhung der cytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration aktiviert TRPM4b. Die durch TRPM4b hervorgerufene Depolarisation der Plasmamembran setzt den elektrochemischen Antrieb für Ca^{2+} herab und begrenzt damit den Ca^{2+} -Einstrom.

1.4.2.3 Spannungsabhängigkeit von TRPM4b

Kennzeichnen spannungsabhängiger Ionenkanäle ist eine positive Ladung in der Transmembranhelix S4, die als Spannungssensor fungiert. Da TRP-Kanälen diese positive Ladung in

S4 fehlt, wurde lange Zeit angenommen, daß TRP-Kanäle nicht spannungsabhängig sind. TRPM4b ist jedoch der erste TRP-Kanal, für den Spannungsabhängigkeit beschrieben wurde (Nilius et al., 2003).

Die Strom-Spannungsbeziehung im Augenblick der Aktivierung, die man durch Bestimmung der 'tail'-Ströme nach einem positiven Vorpuls erhält, ist linear, wie bei einem nicht selektiven Kationenkanal zu erwarten. Bei negativen Potentialen aktiviert und inaktiviert TRPM4b sehr schnell, der Gleichgewichtsstrom ist entsprechend klein. Bei positiven Membranpotentialen hingegen aktiviert TRPM4b dagegen langsam, bleibt aber länger geöffnet und der Strom ist sehr viel größer. Der Gleichgewichtsstrom zeigt somit aufgrund dieser Zeit- und Spannungsabhängigkeit eine ausgeprägt auswärts gleichrichtende IV-Charakteristik (Nilius et al., 2003).

Mittlerweile hat eine genauere Analyse ergeben, daß nicht nur TRPM4b und TRPM5, sondern auch viele weitere TRP-Kanäle spannungsabhängig sind. Der Aktivierungsbereich liegt dabei in aller Regel außerhalb des Bereichs physiologischer Membranpotentiale. Zu einer Aktivierung durch Depolarisation allein, wie bei Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanälen z.B. BK_{Ca} , bei denen eine starke Depolarisation in Abwesenheit von Ca^{2+} zur Aktivierung ausreicht, kommt es daher nicht. Temperatur (wie im Falle TRPV1 oder TRPM8) oder verschiedene Liganden (im Fall TRPV1, TRPM8 oder TRPM4) aktivieren diese Kanäle, in dem sie die Aktivierungskurve in den Bereich physiologischer Potentiale verschieben (Nilius et al., 2005b).

1.4.2.4 Vergleich von TRPM4b und TRPM5

TRPM4b und TRPM5 sind strukturell eng verwandte Kanäle (40% Sequenzidentität auf Aminosäureebene), mit ähnlichen Eigenschaften. TRPM5 wird in den Geschmacksrezeptoren hoch exprimiert und ist an der Geschmacksperzeption beteiligt (Zhang et al., 2003). TRPM5-Mutationen sind am Beckwith-Wiedemann-Syndrom beteiligt, einem Großwuchssyndrom, das mit Fehlbildungen einhergeht und zu bestimmten Tumoren prädisponiert (Prawitt et al., 2000). TRPM5 ist sensitiver gegenüber Ca^{2+} als TRPM4b und die Dosiswirkungskurve für die Aktivierung durch Ca^{2+} verläuft steiler (Hofmann et al., 2003). Bei beiden Kanälen führt die andauernde Erhöhung der cytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration zu einer Inaktivierung des Stroms. Während TRPM4b nach einigen Minuten reaktiviert, tut TRPM5 dies nicht (Nilius et al., 2004a). Im Gegensatz zu TRPM4b wird TRPM5 nicht durch Adenin-Nukleotide inhibiert. Die drei Walker B-Motive und das ATP-Transporter Signatur-Motiv aus TRPM4b sind in TRPM5 nicht konserviert. Spermin inhibiert TRPM4b und TRPM5 hingegen in vergleichbarer Art und Weise (Nilius et al., 2004a).

1.4.2.5 TRPM4b und TRPM5 als CAN-Kanäle

Durch cytoplasmatisches Ca^{2+} aktivierte, nicht-selektive Kationenströme mit hoher Einzelkanalleitfähigkeit von etwa 20-35 pS wurden das erste Mal 1981 an kultivierten Herzzellen der

Ratte gemessen (Colquhoun et al., 1981). An Pankreas-Azinuszellen kann ein entsprechender Strom durch Acetylcholin oder Cholecystokinin aktiviert werden. Nach Exzision des Membranstücks konnte im zellfreien System die direkte Aktivierung durch Ca^{2+} gezeigt werden. Die Eigenschaften von TRPM4b und TRPM5 ähneln diesen sogenannten CAN (Ca^{2+} activated nonselective)-Kanälen, deren molekulare Identität jedoch bislang ungeklärt blieb (Petersen, 2002). Eine Spannungsabhängigkeit der CAN-Kanäle ist nicht beschrieben, jedoch wurde in den frühen Publikationen keine detaillierte Analyse des IV-Zusammenhangs über weite Potentialbereiche durchgeführt, so daß die Spannungsabhängigkeit möglicherweise nicht aufgefallen ist (Hofmann et al., 2003).

1.4.2.6 Rolle von TRPM4b in elektrisch erregbaren Zellen

Aufgrund der Expression von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen hat die Expression von TRPM4b und TRPM5 in elektrisch erregbaren Zellen andere Folgen als in nicht-erregbaren Zellen. Eine Aktivierung von TRPM4b durch Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt über die Depolarisation der Plasmamembran zur Aktivierung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen und damit zum weiteren Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration. In Glattmuskelzellen der Hirngefäße konnten per Patch-clamp-Experiment CAN-Kanäle mit TRPM4b-ähnlicher IV-Charakteristik und Einzelkanalleitfähigkeit nachgewiesen werden. Die Expression von TRPM4, nicht jedoch von TRPM5 in isolierten Glattmuskelzellen konnte mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Durch Verminderung der Expression von TRPM4 mittels Antisense konnten Earley et al. (2004) zeigen, daß TRPM4 an der druck-induzierten Depolarisation und der myogenen Konstriktion der Arterien beteiligt ist.

Guinamard et al. (2004) haben einen Ca^{2+} -aktivierten nicht-selektiven Kationenkanal untersucht, der sich mit der Patch-clamp-Methode in Cardiomyocyten des Atriums nachweisen läßt, und viele der Eigenschaften von überexprimiertem TRPM4b zeigt. RT-PCR-Analyse bestätigte die Expression von TRPM4b in Herzgewebe. Die Expression des Kanals ist einer der Faktoren für die verlängerte Depolarisation, die im Zusammenhang mit Arrhythmien auftreten und damit möglicherweise an der Pathogenese beteiligt.

1.4.2.7 Rolle von TRPM4 in Lymphozyten

Das langanhaltende Ca^{2+} -Signal in T-Lymphozyten ist notwendige Voraussetzung für die Produktion von IL-2 und damit für die antigenspezifische Proliferation nach Aktivierung durch MHC-gebundenes Peptid auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen. Die Bedeutung des Ca^{2+} -Einstrom konnte in mutierten Jurkat T-Zellklonen demonstriert werden (Fanger et al., 1995; Serafini et al., 1995) und die physiologische Bedeutung für die Immunantwort unterstreichen Patienten mit einer Immundefizienz, die auf einem Defekt des Ca^{2+} -Influx-Systems beruht (Partiseti et al., 1994). Besondere Bedeutung kommt dabei Ca^{2+} -Oszillationen zu, die an der Regulation der Genexpression beteiligt sind (Dolmetsch et al., 1998). Die Ca^{2+} -

Oszillationen in Lymphozyten unterscheiden sich von denen in den meisten anderen Zelltypen, weil sie durch Fluktuationen im Ca^{2+} -Einstrom und nicht durch Oszillationen der Ca^{2+} -Freisetzung hervorgerufen werden (Randriamampita und Trautmann, 2004). Bisher ist man davon ausgegangen, daß diese Fluktuationen des Ca^{2+} -Einstroms auf zeitliche Verzögerungen zwischen Speicher-Entleerung und I_{CRAC} -Aktivierung, sowie Auffüllung der Speicher und I_{CRAC} -Inaktivierung zurückzuführen sind.

Wie oben beschrieben, konnten Launay et al. (2004) zeigen, daß TRPM4b in lymphozytären Zelllinien und in Thymozyten der Maus exprimiert wird. Die T-Zelllinie Jurkat zeigt nach Stimulation mit Lektinen wie PHA Oszillationen der Ca^{2+} -Konzentration, die vom Einstrom von Ca^{2+} abhängen (Lewis und Cahalan, 1989). Unterdrückung der endogenen Expression von TRPM4b in Jurkat T-Lymphozyten durch siRNA führte dazu, daß sich in den Zellen als Antwort auf PHA keine Ca^{2+} -Oszillationen, sondern ein langanhaltendes Ca^{2+} -Plateau einstellte. Der verstärkte Ca^{2+} -Einstrom hatte eine höhere IL-2-Produktion zur Folge (Launay et al., 2004). Die Pyrazol-Verbindung YM-483 inhibiert Ca^{2+} -Einstrom und Cytokin-Produktion in Lymphozyten, indem sie TRPM4b aktiviert (Takezawa et al., 2004). Launay et al. (2004) haben auf Basis ihrer Daten folgendes Modell formuliert: Nach der Stimulation mit dem Lectin kommt es zur Aktivierung von I_{CRAC} und das einströmende Ca^{2+} depolarisiert die Membran. Der Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration und die Membrandepolarisation aktivieren TRPM4b. Der Na^+ -Strom durch TRPM4b depolarisiert die Membran weiter und verhindert damit weiteren Ca^{2+} -Einstrom. Aufgrund der Ca^{2+} -Extrusion sinkt die Ca^{2+} -Konzentration. Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanäle und K_V -Kanäle repolarisieren die Membran, der Ca^{2+} -Einstrom durch I_{CRAC} nimmt wieder zu und der Zyklus beginnt von neuem.

2 Problemstellung

Ionenkanäle nicht-erregbarer Zellen werden zunehmend als wichtige zelluläre Modulatoren wahrgenommen und sind daher eines der vielversprechendsten Gebiete für die Entwicklung neuer therapeutisch einzusetzender Pharmaka. Die TRP-Ionenkanäle bilden eine Superfamilie mit breiter Expression sowohl in nicht-erregbaren als auch in elektrisch erregbaren Zellen. Seit vor 10 Jahren mit TRPC1 der erste TRP-Kanal in Säugetieren beschrieben wurde, sind eine Vielzahl weiterer TRP-Kanäle hinzugekommen. In letzter Zeit haben dabei insbesondere die Kanäle der Melastatin-verwandten TRP-Kanäle (TRPM) zunehmendes Interesse auf sich gezogen. Zu Beginn dieser Arbeit wurde im Rahmen einer Datenbank-Analyse die Sequenz einer cDNA gefunden (FLJ20041, GenBank, gi:7019878), deren hypothetisches Proteinprodukt im Hydrophobizitätsplot mehrere potentielle Transmembranhelices aufwies und das sich durch hohe Homologie zu Mitgliedern der TRPM-Familie auszeichnete. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die cDNA aus einem geeigneten Zellsystem kloniert, rekombinant exprimiert und das Proteinprodukt in Hinblick auf eine mögliche Funktion als Ionenkanal untersucht werden. Insbesondere sollten stabil transfizierte Zelllinien erzeugt und mit Hilfe fluorimetrischer und elektrophysiologischer Methoden auf Veränderungen des Membranpotentials und des zellulären Ca^{2+} -Signals untersucht werden. Da in den letzten Jahre erste Arbeiten über die Elektrophysiologie der TRPM-Kanäle, insbesondere auch über den in der vorliegenden Arbeit untersuchten, mittlerweile als TRPM4 bezeichneten, Kanal erschienen sind, wurde das Augenmerk im Verlauf der Arbeit vermehrt auf die Bedeutung von Splicevarianten, deren intrazelluläre Lokalisation, sowie den Einfluß der Expression dieser Splicevarianten auf das zelluläre Ca^{2+} -Signal und das Membranpotential an intakten Zellen gerichtet.

Desweiteren sollte im Rahmen eines Projektes zur Charakterisierung eines möglichen ADPR/TRPM2-Signalweges im Patch-clamp-Experiment untersucht werden, ob Jurkat T-Lymphozyten TRPM2 funktional exprimieren. Anschließend sollte dieses System eingesetzt werden, um an endogen exprimierten TRPM2-Kanälen die Wirkung verschiedener Pharmaka auf die direkte Aktivierung von TRPM2 durch ADPR zu untersuchen. Auf diese Weise sollte nach Pharmaka gesucht werden, mit denen später im zellulären Kontext eine mögliche Signalvermittelte Bildung von ADPR und anschließende Aktivierung von TRPM2 untersucht werden kann.

3 Material & Methoden

3.1 Zellkultur

In den beschriebenen Versuchen wurden verschiedene Zelllinien verwendet. Die Untersuchungen zu TRPM4 wurden im wesentlichen mit HEK-293-Zellen durchgeführt. Für die Lokalisationsstudien wurden darüber hinaus COS-7- und CHO-Zellen eingesetzt. Die elektrophysiologischen Studien zu TRPM2 erfolgten am Subklon JMP der Jurkat-Zelllinie.

3.1.1 HEK-293-Zellen

Die Zelllinie HEK-293 (human embryonic kidney-293) wurde aus primärem, mit Adenovirus Typ 5 (Ad 5) transformiertem, humanem embryonalem Nierengewebe etabliert ([Graham et al., 1977](#)). Die etwa 16 μm großen Zellen wachsen adhären als Monolayer und zeigen eine fibroblastenartige Morphologie. Die in dieser Arbeit verwendeten HEK-293-Zellen stammen aus zwei verschiedenen Quellen: die für die Lokalisations-Studien verwendeten Zellen wurden von Dr. Kreienkamp aus dem Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie zur Verfügung gestellt, die später für die stabile Transfektion eingesetzten HEK-293-Zellen stammen aus der Arbeitsgruppe Dr. Jücker / Prof. Mayr. aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie des UKE.

3.1.2 COS-7-Zellen

Die Zelllinie COS-7 wurde aus der Affen-Zelllinie CV-1 (aus *Cercopithecus aethiops*) nach Transformation mit einer Origin-defekten SV40-Mutante etabliert ([Gluzman, 1981](#)). Die fibroblastenartigen Zellen wachsen adhären als Monolayer, sind jedoch weit größer als HEK-293-Zellen und spreiten sehr viel stärker. Die in dieser Arbeit verwendeten COS-7-Zellen wurden von Dr. Glassmeier aus dem Institut für Angewandte Physiologie des UKE zur Verfügung gestellt.

3.1.3 CHO-Zellen

Die Zelllinie CHO wurde aus dem Biopsie-Material der Ovarien eines Hamsters etabliert ([Puck et al., 1958](#)). Es handelt sich wie bei HEK-293- und COS-7-Zellen um fibroblastenartige Zellen mit adhärenem Wachstum. Die in dieser Arbeit verwendeten CHO-Zellen wurden von Dr. Glassmeier aus dem Institut für Angewandte Physiologie des UKE zur Verfügung gestellt.

Alle verwendeten adhärenen Zelllinien zeigen eine geringe endogene Expression von Ionenkanälen, die sie für die elektrophysiologische Analyse überexprimierter Ionenkanäle geeignet erscheinen läßt. HEK-293-, COS-7 und CHO-Zellen fallen in die gentechnische Risikogruppe 1.

3.1.4 Jurkat-Zellen

Die Jurkat-Zelllinie (z.T. auch als JM bezeichnet, obwohl es sich bei Jurkat und JM um zwei Schwester-Klone handelt, die aus dem selben Patienten isoliert wurden) wurde 1976 aus dem peripheren Blut eines 14-jährigen Jungen mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) isoliert (Schneider et al., 1977). Jurkat-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Analyse der an der Aktivierung von T-Lymphozyten beteiligten Signalprozesse (Abraham und Weiss, 2004). Der verwendete Subklon JMP wurde auf hohe Expression des Oberflächenantigens CD3, eines Bestandteils des T-Zell-Rezeptor-Komplexes, selektiert.

3.1.5 Passage von Zellen

Alle Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂ im CO₂-Inkubator kultiviert. Die adhären wachsenden Zelllinien HEK-293, COS-7 und CHO wurden alle drei bis vier Tage in einer Verdünnung von 1 : 5 bis 1 : 20 umgesetzt. Für die Passage wurden die Zellen zunächst mit Ca²⁺/Mg²⁺-freiem PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin/EDTA pro 25 cm² Kulturfläche vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Anschließend wurden die abgelösten Zellen in frischem Kulturmedium aufgenommen, resuspendiert und in eine neue Kulturflasche überführt. Die in Suspension wachsenden JMP-Zellen wurden alle zwei bis drei Tage in ihrer Vitalität und Zelldichte bestimmt und die Dichte der vitalen Zellen mit frischem Kulturmedium auf 0.3 · 10⁶ Zellen/ml eingestellt, so daß die Zellsuspension stets eine Dichte zwischen 0.3 · 10⁶ und 1.2 · 10⁶ Zellen/ml aufwies.

3.1.6 Kryokonservierung von adhärenen Zellen

Zum Einfrieren wurden HEK-293-, COS-7- und CHO-Zellen in einer Dichte von 1 – 2 · 10⁶ Zellen/ml in 0°C kaltem Einfrier-Medium aufgenommen und in Kryoröhrchen aliquotiert. Die Aliquots wurden über Nacht bei –80°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen dem Stickstofftank entnommen, bei 37°C im Ethanol-Bad angetaut und der Eisblock mit den Zellen in eine Flasche mit 25 cm² Kulturfläche (T25-Flasche) mit auf 37°C vorgewärmtem Kulturmedium überführt. Anschließend wurden die Zellen im Brutschrank kultiviert und gegebenenfalls am Tag darauf das Medium gewechselt, um Zelldebris zu entfernen.

3.1.7 Puffer und Lösungen

- Einfrier-Medium für adhärenzte Zelllinien: 80% (v/v) FCS; 10% (v/v) DMSO; 10% (v/v) α -MEM-Grundmedium mit Glutamax I
- Kulturmedium CHO: α -MEM-Grundmedium mit Glutamax I; 10% (v/v) FCS; 100 U/ml Penicillin, 50 μ g/ml Streptomycin
- Kulturmedium HEK-293 / COS-7: DMEM-Grundmedium mit Glutamax I; 10% (v/v) FCS; 100 U/ml Penicillin, 50 μ g/ml Streptomycin
- Kulturmedium Jurkat JMP: RPMI-Grundmedium mit Glutamax I; 25 mM HEPES; 7.5% (v/v) FCS; 100 U/ml Penicillin, 50 μ g/ml Streptomycin
- PBS (Ca^{2+} / Mg^{2+} -frei): 140 mM NaCl; 3 mM KCl; 8 mM Na_2HPO_4 ; 1.5 mM KH_2PO_4 ; pH 7.4 (mit HCl)
- Selektionsmedium HEK-293: Kulturmedium HEK-293 / COS-7 mit 400 μ g/ml G-418-Sulfat
- Trypsin/EDTA: 0.05% (w/v) Trypsin; 0.02% EDTA (w/v) in Ca^{2+} / Mg^{2+} -freiem PBS

3.1.8 Geräte

- CASY TT1-Zellzähler (Schärfe Systeme, Reutlingen)
- CO_2 -Inkubator (Heraeus, Hanau)
- Sterile Werkbank (BDK, Sonnenbühl-Genkingen)
- Lichtmikroskop (Will, Wetzlar)
- Hämocytometer mit Teilung nach Neubauer (Hellma, Müllheim)
- Zentrifuge Varifuge 3.OR (Heraeus, Hanau)

3.2 Molekularbiologische Techniken

3.2.1 Präparation von Gesamt-RNA aus HEK-293-Zellen

Zur Präparation von Gesamt-RNA wurden ca. $5 \cdot 10^6$ bis $2 \cdot 10^7$ Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA vom Boden der Kulturschale abgelöst, in Kulturmedium resuspendiert und zentrifugiert (500xg, 5 min, RT). Aus dem Zellpellet wurde mit Hilfe des RNeasy-Kits der Fa. Qiagen nach Vorgabe des Herstellers die Gesamt-RNA isoliert. Für die Fragmentierung der genomischen DNA wurden QiaShredder-Säulchen (Qiagen, Hilden) eingesetzt. Zusätzlich zum Standard-Protokoll des Herstellers wurde während der RNA-Präparation ein DNase-Verdau auf der Säule durchgeführt, um DNA-Kontaminationen auszuschließen. Die RNA wurde in RNase-freiem Wasser eluiert und bis zur Verwendung bei -70°C gelagert. Die

Konzentration der RNA-Präparation wurde durch photometrische Bestimmung der Absorption bei 260 nm ermittelt. Eine OD_{260nm} von 1 entspricht dabei einer RNA-Konzentration von $40 \mu\text{g/ml}$ (Gallagher, 1995). Um Verunreinigungen der Präparation mit Protein auszuschließen wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm bestimmt. Präparationen mit einem Verhältnis OD_{260nm}/OD_{280nm} von 2.0 bis 2.2 wurden als sauber erachtet und für weitere Anwendungen eingesetzt (Gallagher, 1995). Da das Absorptionsverhalten von Nucleinsäuren vom pH-Wert abhängt und Proteinkontaminationen bei alkalischem pH-Wert leichter zu detektieren sind, wurden die Messungen in TE-Puffer bei pH 8.0 durchgeführt (Wilfinger et al., 1997).

3.2.2 One Tube RT-PCR

Sowohl für den Nachweis der Expression von TRPM4, als auch für die einzelnen Schritte der Klonierung wurde das Titan One Tube RT-PCR-System (Roche, Mannheim) eingesetzt. Die Durchführung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

Reaktionsansätze für die RT-PCR:

Mix A		Mix B	
0.2 mM	dNTPs	10 μl	RT-PCR Puffer
0.4 μM	forward Primer	1 μl	Enzym-Mix
0.4 μM	reverse Primer		
5 U	RNase Inhibitor		
5 mM	DTT		
50 ng - 2 μg	RNA template		
ad 25 μl	aqua bidest	ad 25 μl	aqua bidest

Für RT-PCRs die den GC-reichen Bereich in Exon 17 von TRPM4 überspannen wurden dem Mix A 4% DMSO zugesetzt (Endkonzentration im Reaktionsansatz 2% DMSO). Durch das DMSO wird das Aufschmelzen dieses sehr stabilen Bereichs erleichtert. Die RT-PCR wurde im Thermocycler mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

Zyklen	Dauer	Temperatur	Prozeß
1	30 min	50°C	Synthese des Erststranges
1	2 min	95°C	Initiale Denaturierung
30	10 s	95°C	Schmelzen
	30 s	55-60°C	Annealing
	1 min/kb	68°C	Elongation
1	7 min	68°C	Finale Elongation
1		4°C	Lagerung

Die Temperatur für das Annealing richtet sich nach den verwendeten Primern. Die Produkte der RT-PCR wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert (s. Abschnitt 3.2.4). Zur Klonierung wurden die Amplifikate mit dem PCR-Purification-Kit (Roche, Mannheim) gereinigt und umgepuffert.

3.2.3 Restriktionsverdau von DNA

Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden entweder von MBI-Fermentas (St. Leon-Rot) oder von NEB New England Biolabs (Ipswich, USA) bezogen. Für die Reaktionsansätze wurde der von den Herstellern empfohlene 10xPuffer verwendet. Bei Restriktionsansätzen mit zwei oder mehr Restriktionsenzymen wurde der Puffer 2xY⁺/Tango (MBI Fermentas) verwendet. In einem Standard-Reaktionsansatz mit einem Volumen von 10 μ l wurde 1 μ g Plasmid-DNA mit 2 Units Restriktionsenzym pro erwarteter Schnittstelle für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Der Erfolg des Restriktionsverdaus wurde in einer Agarose-Gelelektrophorese (s. Abschnitt 3.2.4) überprüft.

Wurden die DNA-Fragmente für weitere Reaktionen eingesetzt, so wurden entweder die Restriktionsenzyme bei 80°C für 20 min thermisch inaktiviert, oder eine Aufreinigung mit dem PCR-Purification-Kit (Roche, Mannheim) nach Vorgabe des Herstellers durchgeführt, wenn die Pufferbedingungen mit nachfolgenden Reaktionen inkompatibel waren.

3.2.4 Agarosegelelektrophorese

0.5% bis 2% (w/v) Agarose (FMC Bioproducts, Rockland, USA) wurden in 50 ml 1xTAE-Puffer gelöst und aufgeköcht. Anschließend wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0.4 μ g/ml zugegeben, durchmischt und das Gel in die Gelkammer gegossen. Nach Erkalten wurden Kamm und Gießsperren entfernt, 1xTAE-Puffer hinzugegeben und die Proben, die zuvor mit 6xLaufpuffer versetzt worden waren, aufgetragen. Als Größen-Marker wurden 100 bp ladder plus (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) und λ /*EcoRI*+*HindIII* (Fermentas) eingesetzt. Die Trennung erfolgte bei 100 V für etwa eine Stunde. Das Muster der aufgetrennten DNA-Fragmente wurde auf einem UV-Transilluminator bei 321 nm detektiert und dokumentiert.

3.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Auf die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde aus technischen Gründen weitgehend verzichtet. Es wurden zumeist ganze Restriktionsansätze für die Ligation eingesetzt und die gewünschten Ligationsprodukte anschließend durch PCR-Screening der Bakterien-Klone identifiziert. DNA-Fragmente wurden mit der DNA-Ligase aus dem Bak-

teriophagen T4 (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) ligiert. T4-DNA-Ligase ist mit den meisten Puffern für Restriktionsenzyme kompatibel, so daß in der Regel auf eine Umpufferung verzichtet werden konnte. In einem Standard-Ligationsansatz mit einem Volumen von 20 μl wurden 0.5 mM ATP, 4 Weiss-Units T4-Ligase, 25 ng des Empfängervektors und ein dreifacher molarer Überschuß des Inserts eingesetzt. Die Ligation erfolgte für 30 min bei RT. Anschließend wurde die Ligase für 10 min bei 60°C hitzeinaktiviert und die Ligationsprodukte unverzüglich für die Transformation in *E. coli* (siehe Abschnitt 3.2.6) eingesetzt.

3.2.6 Transformation von *E. coli* und Präparation von Plasmid-DNA

Zur Transformation wurden 1 ng Plasmid-DNA oder 10 – 20 μl aus einem Ligationsansatz zu einem Aliquot (100 μl) kompetenter Bakterien gegeben. Der Ansatz wurde 20 min auf Eis inkubiert, dann für eine Minute auf 42°C erhitzt und zwei Minuten auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde der Transformationsansatz mit 1 ml SOC-Medium versetzt und für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Im Falle der Transformation von Plasmiden wurde 100 μl der Suspension auf Agarplatten mit Antibiotikum ausplattiert. Bei Ligationsansätzen wurden die Bakterien pelletiert (5000xg, 1 min, RT), das Pellet in etwa 100 μl LB-Medium resuspendiert und ausplattiert. Die Platte mit der Bakterien-Kultur wurde über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Für eine Mini-Präparation (<25 μg Plasmid-DNA) wurden anschließend 2 – 3 ml Selektionsmedium mit einer resistenten Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C, 225 Upm im Schüttelinkubator kultiviert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem Silica Spin Kit (Whatman, Göttingen) nach Vorgabe des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde mit 50 μl 10 mM Tris/HCl pH 8.8 eluiert und bis zur Verwendung bei –20°C gelagert.

Für die Isolierung größerer Mengen endotoxin-freier Plasmid-DNA für die Transfektion eukaryotischer Zellen wurden 200 ml Selektionsmedium aus einer logarithmisch wachsenden Minikultur (ca. 6 – 8 h nach Inokulation) beimpft und über Nacht bei 37°C und 225 Upm inkubiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA (300 – 500 μg) erfolgte mit dem Endofree Plasmid-Maxi-Kit (Qiagen, Hilden) nach Vorgabe des Herstellers. Insbesondere wurden ausschließlich sterile Einwegartikel verwendet, um eine Kontamination mit Endotoxinen zu vermeiden. Für die Fällung der DNA wurden Edelstahl-Zentrifugenbecher verwendet, die zuvor bei Ü/N auf 180°C erhitzt wurden. Die Plasmid-DNA wurde in 400 μl Wasser (Aqua ad injectabilia; Braun, Melsungen) gelöst und umgehend bei –20°C eingefroren.

Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde durch photometrische Bestimmung der Absorption bei 260 nm ermittelt. Eine $\text{OD}_{260\text{nm}}$ von 1 entspricht dabei einer DNA-Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Gallagher, 1995). Um Verunreinigungen der Präparation mit Protein auszuschließen, wurde zusätzlich die Absorbtion bei 280 nm bestimmt. Präparationen mit einem Verhältnis $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ von 1.8 bis 2.0 wurden als sauber erachtet und für weitere Anwendungen eingesetzt (Gallagher, 1995). Da das Absorbtionsverhalten von Nucleinsäuren

vom pH-Wert abhängt und Proteinkontaminationen bei alkalischem pH-Wert leichter zu detektieren sind, wurden die Messungen in TE-Puffer bei pH 8.0 durchgeführt (Wilfinger et al., 1997).

3.2.7 PCR-basierte Mutagenese

Die PCR-basierte Mutagenese nach dem QuikChange-Protokoll basiert auf der Fähigkeit des Restriktionsenzym *DpnI*, selektiv methylierte DNA abzubauen (Nelson und McClelland, 1992). Das Plasmid wird in seiner gesamten Länge durch lineare PCR amplifiziert, dabei wird über die verwendeten Primer die gewünschte Mutation eingebracht, anschließend wird das methylierte, bakterielle Ausgangs-Plasmid mit *DpnI* abgebaut, während das unmethylierte, mutierte PCR-Amplifikat erhalten bleibt. Transfektion in *E. coli* führt dann zur Zirkularisierung und Amplifikation des mutagenisierten Plasmids. Neben einer modifizierten QuikChange-Mutagenese für die Reversion einer Punktmutation (Abschnitt 3.2.7.1) wurde ein Protokoll zur sogenannten Fusion-PCR eingesetzt, um ein vollständiges Exon zu inserieren (Abschnitt 3.2.7.2). Bei beiden Verfahren wurde eine Pfu-Polymerase (PfuTurbo, Stratagene) eingesetzt, da deren Präzision bei der DNA-Synthese ausreichend ist für die Amplifikation ganzer Vektoren.

3.2.7.1 Modifizierte QuikChange-Mutagenese zur Reversion einer Punktmutation

Die Reversion der Punktmutation erfolgte mit den Primern TRPM4 / MutA und TRPM4 / MutB in Anlehnung an die von Wang und Malcolm (1999) beschriebene Methode. In einer linearen PCR wurden zunächst zwei einzelsträngige Vektoren amplifiziert:

Reaktionsansätze und Temperaturprogramm für die Preamplifikation:

	Mix A	Mix B	Zyklen	Dauer	Temp.	Prozeß
10xPfu-Puffer	5 μ l	5 μ l	1	30 s	95°C	Denaturierung
TRPM4 / MutA	0.2 μ M	-	10	30 s	95°C	Schmelzen
TRPM4 / MutB	-	0.2 μ M		1 min	55°C	Annealing
Ausgangs-Vektor	200 ng	200 ng		12 min	68°C	Elongation
dNTPs	0.2 mM	0.2 mM				
PfuTurbo	1.25 U	1.25 U				
aqua bidest	ad 50 μ l	ad 50 μ l				

Anschließend wurden die beiden Ansätze gemischt (25 μ l Mix A + 25 μ l Mix B + 0.625 Units PfuTurbo) und in einer weiteren Runde jetzt exponentieller PCR (zusätzliche 18 Zyklen desselben Programms) ausreichend Vektor für die Transformation generiert. Abschließend wurde

der Ausgangs-Vektor mit *DpnI* (10 Units, 1 h Inkubation bei 37°C) verdaut und 10 µl des Ansatzes für die Transformation von *E.coli* eingesetzt wie in Abschnitt 3.2.6 beschrieben.

3.2.7.2 Fusion-PCR zur Insertion von Exon 17

Die Insertion des fehlenden Exons erfolgte mit den Primern Exon 15 Insert 5' und Exon 15 Insert 3' in Anlehnung an die von [Smith und Klugman \(1998\)](#) beschriebene Methode. In einer linearen PCR wurden zunächst die 'Mega-Primer' mit dem Exon erzeugt:

Reaktionsansätze und Temperaturprogramm für die erste Preamplifikation:

	Mix A	Mix B	Zyklen	Dauer	Temp.	Prozeß
10xPfu-Puffer	5 µl	5 µl				
Exon 15 Insert 5'	0.2 µM	-	1	30 s	95°C	Denaturierung
Exon 15 Insert 3'	-	0.2 µM	10	30 s	95°C	Schmelzen
Vektor	30 ng	30 ng		30 s	55°C	Annealing
dNTPs	0.2 mM	0.2 mM		1 min	72°C	Elongation
DMSO	2%	2%				
PfuTurbo	1.25 U	1.25 U				
aqua bidest	ad 50 µl	ad 50 µl				

Nach dem Generieren der Megaprimer wurde zu jedem der Ansätze 90 ng des Vektors pGEM-TRPM4aΔ15 als Ausgangsvektor gegeben, in einer linearen PCR entstanden während der 2. Preamplifikation die Einzelstränge des Vektors pGEM-TRPM4a. Anschließend wurden die beiden Ansätze gemischt (25 µl Mix A + 25 µl Mix B + 0.625 Units PfuTurbo + 0.1 mM dNTPs) und in einer weiteren Runde jetzt exponentieller PCR ausreichend Vektor für die Transformation generiert.

2. Preamplifikation:

Zyklen	Dauer	Temp.	Prozeß
1	30 s	95°C	Denaturierung
10	30 s	95°C	Schmelzen
	1 min	55°C	Annealing
	18 min	72°C	Elongation

Exponentielle Amplifikation:

Zyklen	Dauer	Temp.	Prozeß
1	30 s	95°C	Denaturierung
18	30 s	95°C	Schmelzen
	30 s	55°C	Annealing
	1 min	72°C	Elongation

Abschließend wurde das Template mit *DpnI* (10 Units, 1 h Inkubation bei 37°C) verdaut und 10 µl des Ansatzes für die Transformation von *E.coli* eingesetzt wie in Abschnitt 3.2.6 beschrieben.

Nach Minipräparation der Plasmid-DNA (s. Abschnitt 3.2.6) der Klone wurde der Erfolg der

Mutagenese durch Sequenzierung (s. Abschnitt 3.2.8) überprüft.

3.2.8 DNA-Sequenzierung

Die für das jeweilige Protein kodierende Sequenz der Expressionsvektoren wurde durch Sequenzierung verifiziert um Mutationen auszuschließen. Die Sequenzierung erfolgte mit dem Big Dye Terminator Cycle Sequencing-Kit (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) mittels einer modifizierten Kettenabbruchreaktion nach Sanger. Dabei werden in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) statistisch fluoreszenzmarkierte Didesoxy-Nukleotide eingebaut, die zu einem Abbruch der Kette führen und die abgebrochene Kette gleichzeitig, abhängig vom eingebauten Nukleotid, mit unterschiedlicher Fluoreszenz markieren.

Reaktionsansatz und Temperaturprogramm für die DNA-Sequenzierung:

		Zyklen	Dauer	Temperatur	Prozeß
800 ng – 1 µg	Plasmid-DNA	25	10 s	95°C	Schmelzen
15 pmol	Primer		5 s	50°C	Annealing
3 µl	Big Dye Enzymmix		240 s	60°C	Elongation
5 µl	Half Term Puffer	1		4°C	Lagerung
ad 20 µl	bidest. H ₂ O				

Bei Sequenzierreaktionen mit besonders hohem GC-Anteil im zu sequenzierendem Abschnitt wurde der Sequenzierreaktion 2% (v/v) DMSO zugesetzt. Durch das DMSO wird das Aufschmelzen der sonst sehr stabilen GC-Basenpaarungen erleichtert (Choi et al., 1999).

Anschließend wurden überschüssige Didesoxy-Nukleosidtriphosphate durch eine einfache Gel-filtration mit dem DyeEx II-Kit (Qiagen, Hilden) von den Amplifikaten abgetrennt und das Filtrat mit den Amplifikaten an der Speed-Vac bis zur Trockne eingengt. In der Servicegruppe des Instituts für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie unter der Leitung von Dr. F. Buck wurden die Sequenzieransätze mit dem ABI Prism 310 Genetic Analyzer durch Kapillar-Gelelektrophorese analysiert. Das Assemblieren der Contigs und der Vergleich der Sequenzen erfolgte mit dem Programm BioEdit (Hall, 1999).

3.2.9 Transfektion eukaryotischer Zelllinien

Die Transfektion von HEK-293, CHO und COS-7-Zellen erfolgte nach der Calciumphosphat-Präzipitationsmethode (Ausubel et al., 1995). Die zu transfizierenden Zellen wurden am Abend vor Transfektion in 35 mm-Kulturschalen umgesetzt, so das die Konfluenz zum Zeit-

punkt der Transfektion ungefähr 80% betrug. Eine Stunde vor Transfektion wurde das Medium gegen frisches Kulturmedium ersetzt, um den richtigen pH zu gewährleisten. 50 µg der zu transfizierenden DNA wurden mit Wasser und 2.5 M CaCl₂-Lösung auf ein Volumen von 500 µl und eine Ca²⁺-Konzentration von 250 mM eingestellt. In einem konischen 15 ml PP-Röhrchen wurden 500 µl 2xHeBS vorgelegt und durch Einblasen von Luft mit einer Pasteurpipette und einer Pipettierhilfe in ständiger Bewegung gehalten. Die DNA/Ca²⁺-Lösung wurde langsam in den HeBS-Puffer getropft. Anschließend wurde die Lösung für 5 – 10 s gevortext und 20 min bei RT inkubiert. Die Suspension mit dem Transfektionskomplex wurde auf sechs 35 mm-Kulturschalen verteilt. Nach 6 h wurde der Transfektionskomplex von den Zellen entfernt, diese zweimal mit auf 37°C vorgewärmtem Kulturmedium gewaschen und neues, vorgewärmtes Kulturmedium auf die Zellen gegeben.

3.2.10 Selektion und Klonierung stabiler Zelllinien

In einem Vorversuch wurde die geeignete Konzentration des Antibiotikums ermittelt: bei einer G418-Konzentration von 400 µg/ml setzte bei Wildtyp-Zellen nach einer Woche massiver Zelltod ein und nach zwei Wochen waren keine vitalen Zellen mehr vorhanden. Zur Generierung stabiler Zelllinien wurden die Zellen 24 h nach Transfektion durch Zugabe von 400 µg/ml G418-Sulfat zum Kulturmedium für die Dauer von zwei Wochen selektioniert.

Die überlebenden G418-resistenten Zellen wurden in einer Verdünnung von 0.3 Zellen pro Vertiefung in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen in Kulturmedium mit 400 µg/ml G-418 ausgesät und etwa zwei Wochen bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Auf diese Weise isolierte Klone wurden in Selektionsmedium expandiert und anschließend durch RT-PCR und Westernblotting auf die Expression von TRPM4 untersucht.

3.2.11 Verwendete Bakterien

E. coli K12 XL1-blue, Genotyp: F[']:: Tn10 pro A⁺B⁺ lacIqΔ(lacZ)M15 recA1 endA1 gyrA96 (NaI^r) thi hsdR17(rk⁻mk⁺) supE44 relA1 lac

E. coli K12 SCS110, Genotyp: rpsL (Str^r) thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44D (lac-proAB) [F['] traD36 proAB lacI^qZΔM15]

Die aufgeführten Gene bezeichnen die mutierten Allele. Bei den angegebenen Genen auf dem F'-Episome handelt es sich hingegen um die Wildtyp-Allele. *E. coli* K12 XL1-blue wurden für Standard-Klonierungen verwendet, dieser Stamm exprimiert jedoch wie die meisten *E. coli* K12 Gene, deren Produkte die Methylierung von Adenin-Basen (dam) bzw. Cytosin-Basen (dcm) in spezifischen Sequenzen katalysieren. Das verhindert den Verdau von Plasmiden, die in *E. coli* K12 XL1-blue propagiert wurden, mit methylierungs-sensitiven Enzymen wie XbaI. *E. coli* K12 SCS110 fehlt sowohl die dam- als auch die dcm-Aktivität, so daß DNA, die in diesem Stamm propagiert wurde, mit methylierungssensitiven Enzymen geschnitten werden

kann.

3.2.12 Vektoren

Folgende kommerzielle Vektoren wurden für Klonierung und Expression der cDNAs von TRPM4 eingesetzt:

Vektor	Verwendung	Hersteller
pcDNA	eukaryontischer Expressionsvektor	Invitrogen, Karlsruhe
pECFP-ER	eukaryontischer Expressionsvektor für ER-lokalisiertes ECFP	BD Clontech, Heidelberg
pECFP-Mem	eukaryontischer Expressionsvektor für Plasmamembran-lokalisiertes ECFP	BD Clontech, Heidelberg
pEGFP-C1	eukaryontischer Expressionsvektor für die Expression von Fusionsproteinen mit N-terminalem EGFP	BD Clontech, Heidelberg
pEGFP-N1	eukaryontischer Expressionsvektor für die Expression von Fusionsproteinen mit C-terminalem EGFP	BD Clontech, Heidelberg
pGEM-T easy	Vektor für die TA-Klonierung von PCR-Produkten	Promega, München

3.2.13 Primer

Die für die Primerauswahl verwendeten Sequenzen entstammen der GenBank des NCBI ([Benson et al., 2005](#)). Für die Auswahl geeigneter Primer wurde das Programm Primer3 ([Rozen und Skaletsky, 2000](#), http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) verwendet. Soweit möglich wurden die Primer so gewählt, dass der GC-Gehalt zwischen 50 und 60% und die Schmelztemperatur zwischen 55 und 60°C lag und die Primer am 3'-Ende ein G oder C aufweisen („GC-clamp“). Die ausgewählten Primer wurden mit dem Programm OligoAnalyzer (<http://scitools.idtdna.com/scitools/Applications/OligoAnalyzer>) auf Selbstkomplementarität und Bildung von stabilen Haarnadelstrukturen überprüft. Alle Primer wurden bei der Fa. MWG Biotech (Ebersberg) in Auftrag gegeben. Die Primer wurden in Wasser (Aqua ad injectabilia; Braun, Melsungen) gelöst und bei -20°C gelagert.

universelle Sequenzierungs-Primer (5'→3')	
pcDNA3 sense	AAT GTC GTA ACA ACT CCG CC
pcDNA3 antisense	AGG AAA GGA CAG TGG GAG TG
pGEM T sense	GAC GTT GTA AAA CGA CGG CCA GTG
pGEM T antisense	GCT ATG ACC ATG ATT ACG CCA AGC
CMV forward	CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG
IRES reverse	CCT CAC ATT GCC AAA AGA CG
TRPM4-spezifische Primer (5'→3')	
FLJ20041-5'	GCT TCT TTG GGC ACT GTT G
FLJ20041-3'	GGG CTC CTC TTC TGA TTT CC
FLJ20041 / 1	AGC CTG GAT TGT CAC TGG
FLJ20041 / 2	GAC CCT GGA AGA CAC TCT GG
FLJ20041 / 3	AAC TCG CTC ATC CGC AAC
FLJ20041 / 4	TAT CGC AGC AGT GAG GTG AG
FLJ20041 / 5	GCT ACC TGC TGT TC T TGC TG
FLJ20041 / 6	CGT GAG CAA GAT GAT GAA GG
FLJ20041 / rev	GCA T GG CTC A C T CTT TGG AC
TRPM4 / rev 1	TGC TGT TTG TAA GGA TG
TRPM4 / rev 2	AGG AAT CTG TGA GTG GTG AGG
Klonierungsprimer (5'→3')	
TRPM4 / Bam	CTA TGA GGA TCC TGG CTG TAC GGG ACC ATC <i>Bam</i> HI bindend
4b-Sal I-fw	TGT GTC GAC CTG GGC TGC AGG AGG TTG <i>Sal</i> I bindend
4b-rev	GTA CCT CGC AGG GAA CGA G
TRPM4 / Bam / 3' / N	A GG ATC C AC GTC TTT GGA CCC AGG CAG <i>Bam</i> HI linker bindend
TRPM4 / Sal / 5' / N	TGT GTC GAC TGG CTG TAC GGG ACC ATC <i>Sal</i> I bindend
TRPM4 / Sal / 5' / C	TCA GTC GAC GCC AGC ACT GGG GGC ACC AAG <i>Sal</i> I bindend

Mutageneseprimer (5'→3')	
TRPM4 / Mut A	CCG AGT AGT TGT AGT CCA GGG GAA ACT GGA CCC CG
TRPM4 / Mut B	CGG GGT CCA GTT TCC CCT GGA CTA CAA CTA CTC GG
Exon 15 - 5' gen	AGT GGG CAG GAA GGA TGA G
Exon 15 - 3' gen	TCA GGC AGG GTG AGA TGT G
Exon 15 Insert 5'	
TC A TTA AT G GGG AAG GGC CTG TCG G GA CGG CGG ACC CAG CCG AGA AGA	
<i>VspI/AseI</i> Exon 14 ← → Exon 15	
Exon 15 Insert 3'	
AGG TGG TAC AAA CCC GGG GTC AGC CGG CAG CCC ACG CCC AGG AGG AAG C	
Exon 16 <i>SmaI</i> ← → Exon 15	

Aufgrund von Fehlern in den ursprünglich publizierten Sequenzen weichen einige der älteren Primer in der Sequenz von den neueren Datenbank-Einträgen ab. Diese Bereiche sind grün hinterlegt. Restriktions-Schnittstellen in Klonierungsprimern sind dunkelgrau hinterlegt. Die an das Template bindenden Bereiche in Klonierungsprimern sind hellgrau hinterlegt. In den Primern für die Fusion-PCR sind Bereiche, die an unterschiedliche Exons binden, farblich gegeneinander abgegrenzt.

3.2.14 Puffer und Lösungen

- 2.5 M CaCl₂-Lösung: 2.5 M CaCl₂ in bidest. Wasser
- 6xLadepuffer (MBI Fermentas): 10 mM Tris-Cl pH 7.6; 0.03% Bromphenolblau, 0.03% Xylencyanol FF; 60% Glycerol; 60 mM EDTA
- LB-Medium: 1% (w/v) Trypton-Pepton; 0.5% (w/v) Hefe-Extrakt; 1% (w/v) NaCl, durch Autoklavieren sterilisiert
- LB-Agarplatten: LB-Medium mit 1.5% Agar, durch Autoklavieren sterilisiert und auf 60°C abgekühlt, dann wurden Antibiotika zugegeben und die Platten gegossen (Endkonzentration der Antibiotika für LB-Medium und LB-Agarplatten: für Kanamycin 30 µg/ml, für Ampicillin 100 µg/ml)
- 2xHeBS (HEPES-gepufferte Salzlösung): 23 mM HEPES pH 7.05 (mit NaOH); 283 mM NaCl; 1.5 mM Na₂HPO₄
- SOC-Medium: 2% (w/v) Trypton-Pepton; 0.5% Hefeextrakt; 8.55 mM NaCl; 2.5 mM KCl; pH 7.0 (mit NaOH) durch Autoklavieren sterilisiert, 10 mM MgCl₂ und 20 mM Glucose werden nach dem Auoklavieren als steril filtrierte Lösungen zugegeben
- TE pH 8.0: 10 mM Tris pH 8.0 (mit HCl), 1 mM EDTA
- TAE: 40 mM Tris-Acetat pH 8.5 (mit Eisessig); 1 mM EDTA

3.2.15 Geräte

- Brutschrank BE 500 (Mettler, Schwabach)
- Gelelektrophoreseapparatur GNA-100 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
- PCR-Cycler Mastercycler Personal (Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg)
- PCR-Cycler Mastercycler Gradient (Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg)
- Netzteil Power-Pac 3000 (BioRad, München)
- Schüttler WT12 (Whatman, Göttingen)
- Sequenzierautomat ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer, Weiterstadt)
- UV-Transilluminator IL-350-M ($\lambda=321$ nm) (Bachhofer, Reutlingen)
- Tischzentrifuge Biofuge fresco (Heraeus, Hanau)

3.3 Proteinbiochemische Techniken

3.3.1 Affinitätschromatographische Reinigung eines anti-Peptid-Antikörpers gegen TRPM4

Bei der Fa. Vaccine, Rostock, wurde ein Kaninchen-Antikörper gegen das Peptid NH₂-TKAP-ALKGGAAELRPC-COOH aus TRPM4 in Auftrag gegeben. Erste Western-Blot-Experimente zeigten, dass weder das ungereinigte Serum noch eine über Protein G-Sepharose aufgereinigte IgG-Fraktion ausreichend spezifisch waren. Aus diesem Grund wurde mit Hilfe des Immunisierungs-Peptids eine affinitätschromatographische Aufreinigung des spezifischen Antikörpers durchgeführt. Dazu wurden 300 μ g des biotinylierten Peptids in Startpuffer an eine HiTrap-Streptavidin Säule gebunden. Anschließend wurden 10 ml des Serums, das zuvor zur Entfernung von unlöslichen Bestandteilen bei 10.000xg zentrifugiert und durch einen 0.45 μ m Sterilfilter filtriert wurde, mit einer Spritze auf die Säule gegeben. Nach dem Durchlauf wurde mit Startpuffer gespült und mit dem Elutionspuffer eluiert. 100 μ l Fraktionen des Eluats wurden in Neutralisationspuffer aufgefangen. Die Extinktion der einzelnen Fraktionen bei 280 nm wurde im Photometer gemessen. Die Fraktionen bei denen der Antikörper eluierte wurden gepoolt und mit einem Centriprep YM-50 auf PBS umgepuffert und aufkonzentriert. Der Antikörper wurde mit 0.01% NaN₃ versetzt und bei 4°C gelagert.

3.3.2 Präparation von Membranfraktionen und Proteinbestimmung

Zur Herstellung von Membranfraktionen aus stabilen Klonen wurden zwei unterschiedliche Verfahren gewählt. Zunächst wurde ein klassisches Protokoll für die Präparation von Membranfraktionen angewendet. Dabei wurden pro Präparation $4 \cdot 10^8$ Zellen in 5 ml Lysis-Puffer mit Protease-Inhibitor-Cocktail 'Roche complete' aufgenommen und mit dem Potter-Elvehjem-Homogenisator mit 30 Zügen auf Eis aufgeschlossen. In einem ersten Zentrifugationsschritt (2000xg, 10 min, 4°C) wurden nicht aufgeschlossene Zellen und Zellkerne abgetrennt und verworfen. Durch Ultrazentrifugation des Überstandes (100000xg, 90 min, 4°C) wurden die zellulären Membranen von den löslichen Zellbestandteilen getrennt. Das Pellet wurde in 1 ml Lysis-Puffer resuspendiert und die Proteinkonzentration bestimmt. Alternativ wurde das M-PEK-Kit zur Präparation von Membranproteinen aus kleinen Zellmengen (Merck, Darmstadt) verwendet. Dabei wurden $0.4 - 1.0 \cdot 10^7$ Zellen gemäß Herstellerangaben eingesetzt. Anschließend wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt. Membranpräparationen wurden bis zur Verwendung bei -70°C gelagert.

Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurden die Fraktionen 1:10, 1:30 und 1:100 in Lysis-Puffer verdünnt und in Mikrotiterplatten mit $200 \mu\text{l}$ BioRad-Reagenz versetzt. Als Standard diente eine BSA-Verdünnungsreihe. Nach 5 – 30 min Inkubation bei RT erfolgte die Auswertung am Mikrotiterplatten-Photometer bei 595 nm. Für alle Proben wurden Dreifach-Bestimmungen durchgeführt.

3.3.3 Western-Blotting

3.3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Trennung der Proteine in den Membranfraktionen erfolgte in einer diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970).

In einer vertikalen Elektrophoresekammer wurde zunächst ein 7%iges Trenngel gegossen. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wurde ein 3.9%iges Sammelgel überschichtet, in dem durch einen Kamm Probenaschen ausgespart wurden. Nach dem Auspolymerisieren wurde der Kamm entfernt und die Kammern der Apparatur mit SDS-Elektrodenpuffer gefüllt. Es wurden $30 - 75 \mu\text{g}$ Protein in SDS-Probenpuffer zunächst durch Erhitzen (5 Minuten, 95°C) denaturiert und dann in die Probenaschen geladen. Zur besseren Denaturierung und Auftrennung der besonders hydrophoben Membranproteine wurde die SDS-Konzentration in SDS-Elektrodenpuffer, sowie Sammel- und Trenngel auf 0.4% und in den Proben auf 4% erhöht (BioRad-Betriebsanleitung zur Elektrophorese-Kammer).

Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 200 V, wobei die Auftrennung des Molekulargewichtsbereichs zwischen 80 und 200 kDa anhand des Kaleidoscope Prestained Standard (BioRad, München) verfolgt wurde. Nachdem die 80 kDa Markerbande den unteren Rand des Gels erreichte, wurde die Elektrophorese beendet und das Gel für den Transfer auf Nitrocel-

lulose eingesetzt.

3.3.3.2 Transfer der Proteine auf Nitrocellulose-Membranen

Das SDS-Polyacrylamidgel wurde vor dem Transfer für 30 min in Blotpuffer äquilibriert. Die Nitrocellulose-Membranen und Filterpapiere wurden mit dem Blotpuffer benetzt. Anschließend wurden Acrylamidgel, Membran und vier Filterpapiere wie folgt in die Blotapparatur gestapelt:

- (+) Anode
 - 2 Lagen Filterpapier
 - Nitrocellulose-Membran
 - Acrylamid-Gel
 - 2 Lagen Filterpapier
- (-) Kathode

Der Transfer erfolgte bei einem Elektrodenabstand von 4 cm bei 10°C und Wasserkühlung mit 100 V für eine Stunde. Die Transfereffizienz wurde überprüft, in dem die Proteine auf der Nitrocellulose-Membran mit Ponceau S-Lösung gefärbt wurden. Die in der Färbelösung enthaltene Trichloressigsäure fixiert zudem die Proteine auf der Membran. Das transferierte Gel wurde 30 min mit Coomassie Brillant Blue gefärbt und 2 h entfärbt. Bei erfolgreichem Blotting war eine deutliche Färbung der Membran mit Ponceau S zu erkennen, während das Polyacrylamid-Gel keine Proteine mehr enthielt.

3.3.3.3 Immundetektion

Nach Färbung mit Ponceau S und Fixierung auf der Membran wurden unspezifische Bindungstellen der Membran durch Inkubation (1 h, RT) in Blocklösung abgedeckt. Anschließend wurde die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen (einmal 15 min mit großem Volumen, zweimal 5 min mit kleinem Volumen). Nach dem Waschen erfolgte die Inkubation mit dem Affinitäts-gereinigten α -TRPM4-Antikörper (1:3000 in Blocklösung) für 1 h bei RT oder über Nacht bei 10°C. Zum Entfernen überschüssigen Antikörpers wurde die Membran erneut dreimal mit TBS-T gewaschen (einmal 15 min mit großem Volumen, zweimal 5 min mit kleinem Volumen). Abschließend wurde für eine Stunde mit einem HRP(Meerettich Peroxidase)-konjugierten Ziege α -Kaninchen-Antikörper (Dianova, Hamburg) (1:5000 in Blocklösung) inkubiert und erneut dreimal mit TBS-T gewaschen. Zum Nachweis der Peroxidaseaktivität wurde die Nitrocellulose-Membran für 1 min mit ECL-Lösung überschichtet und die Chemilumineszenz durch Belichtung von Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia Biosciences, Freiburg) für 2 – 30 min festgehalten.

3.3.4 Puffer & Lösungen

- Blocklösung: TBS-T mit 5% (w/v) fettarmen Milchpulver
- Coomassie-Entfärbelösung: 40% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure
- Coomassie-Färbelösung: 0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue; 40% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure
- ECL-Reagenz: 50% (v/v) ECL-Lösung A (Amersham Pharmacia Biosciences); 50 % ECL-Lösung B (Amersham Pharmacia Biosciences) direkt vor Gebrauch angesetzt
- Elutionspuffer: 100 mM Glycin pH 2.7 (mit HCl)
- Lysispuffer: 20 mM HEPES pH 7.2; 110 mM NaCl; Proteaseinhibitorcocktail Roche complete
- Neutralisationspuffer: 1 M Tris pH 9.0 (mit HCl)
- Ponceau-Färbelösung: 2% (w/v) Ponceau S; 3% (w/v) Trichloressigsäure
- SDS Elektrodenpuffer: 25 mM Tris pH 8.5; 192 mM Glycin; 0.4% (w/v) SDS
- 6x SDS-Probenpuffer: 350 mM Tris pH 6.8; 30% (v/v) Glycerol; 10% (w/v) SDS, 0.5 M DTT, 0.0012% Bromphenolblau; in bidest. Wasser, bis zur Verwendung in Aliquots (0.5 ml) bei -70°C gelagert
- SDS Sammelgel (3.9%): 125 mM Tris pH 6.8; 3.9% (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30%/0.8%); 0.4% (w/v) SDS; 0.05% (w/v) APS; 0.1% (v/v) TEMED
- SDS Trenngel (7%): 375 mM Tris pH 8.8; 6% (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30%/0.8%); 0.4% (w/v) SDS; 0.05% (w/v) APS; 0.1% (v/v) TEMED
- Startpuffer: 20 mM NaH₂PO₄ pH 7.0 (mit NaOH)
- TBS (Tris gepufferte Salzlösung): 150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 7.4
- TBS-T (Tris gepufferte Salzlösung/Tween 20): TBS mit 0.1% (w/v) Tween 20
- Transferpuffer für Western-Blot: 25 mM Tris pH 8.5; 192 mM Glycin; 20% (v/v) Methanol; 0.025% (v/v) SDS

3.3.5 Geräte

- Blotting-Apparatur Trans-Blot Cell (BioRad, München)
 - Elektrophoresekammer Protean II (BioRad, München)
 - Evehjem-Homogenisator (IKA-Labortechnik, Staufen)
 - Mikrotiterplatten-Photometer (MWG-Biotec, Ebersberg)
 - Netzteil Phero-stab. 500 (Biotec-Fischer, Hamburg)
-

- Ultrazentrifuge CU L-7 80 mit Titan-Festwinkelrotor Ti50 oder Ti80 (Beckmann Coulter, Unterschleißheim)
- Zentrifuge Cryofuge Modell 8500i (Heraeus, Hanau)

3.4 Fluoreszenz-Mikroskopie

Die Lokalisation der EGFP-markierten TRPM4-Isoformen und der ECFP-Varianten zur Lokalisation von Zellorganellen erfolgte an einem digitalen Imaging System (Improvision Systems, Tübingen). Als Lichtquelle diente eine polychromatische Xenon-Bogenlampe deren Licht durch das Gitter eines Monochromators über eine Faseroptik in das Mikroskop eingekoppelt wurde. Durch den Gitterabstand des Monochromators konnte die für die Anregung des Fluorophors notwendige Wellenlänge eingestellt werden. Das von den Zellen emittierte Fluoreszenzlicht gelangte über einen dichroischen Spiegel und einen Emissionsfilter auf den Chip einer CCD-Kamera (ORCA C4742-95-12NRB oder -12ER, Hamamatsu, Enfield). Die Kamera nahm das Licht mit einer räumlichen Auflösung von 1280x1024 Pixel und einer Intensitätsabstufung von 12 bit, d.h. $2^{12}=4096$ Intensitätsstufen, auf. Um eine höhere Empfindlichkeit zu erreichen, z.B. um schnell bleichende, schwach fluoreszierende Objekte aufzunehmen, konnten im sogenannten „Binning“ mehrere Pixel des Chips zu einem Pixel des Bildes zusammengefasst werden. Bei einem Binning von 2 wurden $2 \cdot 2 = 4$ Pixel des Kamera-Chips zu einem Bildpunkt zusammengefasst, die räumliche Auflösung betrug dann 640x512 Pixel.

Streulicht aus Bereichen oberhalb und unterhalb der Fokusebene führt dazu, daß das mit einem nicht-konfokalen Fluoreszenz-Mikroskop aufgenommene Bild stets eine gewisse Unschärfe aufweist. In dem verwendeten Imaging-System wurde dieses Problem durch Dekonvolution angegangen. Dazu wurde nicht ein Bild in der Fokus-Ebene aufgenommen sondern ein ganzer Stapel aus Bildern mit definiertem Abstand. Durch einen mathematischen Algorithmus ('nearest neighbor'-Algorithmus, Improvision, Tübingen) konnte aus den im Stapel liegenden Bildern das Streulicht der darunter und darüber liegenden Ebenen herausgerechnet werden, wobei ein virtuelles Pin-Hole die Menge des zu entfernenden Streulichts bestimmte. Auf diese Weise erhält man schärfere, quasi-konfokale Bilder.

Für die Mikroskopie wurden die Zellen entweder auf Deckgläschen der Größe 1 oder auf kommerziell erhältlichen Glasboden-Kulturschalen mit Glaseinsatz Größe 0 (MatTek, Ashland USA) ausgesät und, wie unter Abschnitt 3.2.9 beschrieben, transfiziert. Die mit dem EGFP- bzw. ECFP-Vektoren transfizierten Zellen wurden 24 - 72 h nach Transfektion mikroskopiert. Um zu verhindern, daß die sehr empfindlichen HEK-293-Zellen sich von der Oberfläche ablösen, wurde auf einen Wechsel des Mediums verzichtet.

Mit einem 40x (COS-7- und CHO-Zellen) bzw. 100x (HEK-293-Zellen) Ölimmersionsobjektiv (numerische Apertur der Linse 1.3; Brechungsindex des Mediums 1.515) wurden um die

Fokus-Ebene zehn bis 100 Bilder mit einem Abstand von $0.2 \mu\text{m}$ aufgenommen. Die Anregung erfolgte bei 435 nm (ECFP) bzw. 488 nm (EGFP). Aufgrund der z.T. sehr geringen Intensität der EGFP-Fluoreszenz erfolgten die Aufnahmen mit einem Kamera-Binning von zwei.

Für die Dekonvolution wurde der 'nearest neighbor'-Algorithmus auf die Bilder in der Nähe der Fokusebene angewendet, es wurden dabei fünf benachbarte Ebenen berücksichtigt. 50 - 70% des Streulichts wurden durch das virtuelle Pin-Hole entfernt.

3.4.1 Geräte

- Imaging System mit Openlab Software Version 3.0.9 (Improvision Systems, Tübingen), bestehend aus:
 - Fluoreszenzmikroskop DM-IRBE oder IRB2 mit Piezo-Stepper (Leica, Solms)
 - Monochromator II oder IV mit Lichtquelle (TILL Photonics, München)
 - CCD-Kamera mit Camera Controller ORCA C4742-95-12NRB oder -12ER (Hamamatsu, Enfield)
 - Computer Macintosh G3 oder G4 (Apple)
 - CD-Brenner (Lacie, Weil am Rhein oder Apple)

3.5 Fluorimetrie

3.5.1 Ratiometrisch-fluorimetrische Bestimmung der intrazellulären Calcium-Konzentration mit Fura-2/AM

Veränderungen der intrazellulären Konzentration freier Ca^{2+} -Ionen wurden, in Anlehnung an die von [Zhu et al. \(1998\)](#) beschriebene Methode, mit dem Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 verfolgt. Für die Messung wurde eine T75-Flasche HEK-293-Zellen mit einer Konfluenz zwischen 80 und 90%, wie in Abschnitt [3.1.5](#) beschrieben, abgelöst und die Zellen mit $\text{ECS}+\text{Ca}^{2+}$ gewaschen (5 min, 500xg, RT). Anschließend wurden die Zellen in 1 ml $\text{ECS}+\text{Ca}^{2+}$ mit $4 \mu\text{M}$ Fura-2/AM aufgenommen, für 30 min bei 37°C inkubiert, erneut in $\text{ECS}+\text{Ca}^{2+}$ gewaschen (5 min, 500xg, RT) und in einer Dichte von $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml in $\text{ECS}+\text{Ca}^{2+}$ resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Aliquots von 2 ml bis zur Messung im Dunkeln bei Raumtemperatur aufbewahrt. Vor jeder Messung wurden die Zellen zweimal mit $\text{ECS}-\text{Ca}^{2+}$ gewaschen. Die Veränderungen in der Fura-2-Fluoreszenz wurden in einem Hitachi F-2000 Spektrofluorimeter verfolgt.

In einer Quartzküvette wurden 2 ml Zellsuspension kontinuierlich gerührt. Die Software des Fluorimeters zeichnete dabei in 5 s Intervallen die Emission bei 495 ± 10 nm nach wechselnder Anregung bei 340 ± 10 nm und 380 ± 10 nm auf. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration wurde nach der Formel von [Grynkiewicz et al. \(1985\)](#) nach Kalibrierung mit 0.1% Triton X-100 für das maximale Ratio und 8 mM EGTA / 60 mM Tris für das minimale Ratio errechnet.

3.5.2 Ratiometrisch-fluorimetrische Bestimmung der Ca^{2+} -Freisetzung aus permeabilisierten Zellen

Die Permeabilisierung der HEK-293-Zellen erfolgte mit dem Detergenz Saponin. Saponine sind Steroid-Glykoside, die sich im wesentlichen in der Zusammensetzung und Struktur ihrer Zuckerreste unterscheiden. Die Fähigkeit der Saponine Zellen zu permeabilisieren beruht nicht auf ihren Detergenzeigenschaften, sondern auf ihrer Fähigkeit, Komplexe mit dem Cholesterol in der Membran zu bilden, sogenannte Digitonide, Dadurch kommt es zu Störungen der Membranstruktur, die man im Elektronenmikroskop als 40 – 50 Å große Löcher sichtbar machen kann (Fiskum, 1985). Intrazelluläre Membranen, wie die des ER und der Organellen unterscheiden sich in ihrem Cholesterolgehalt von der Plasmamembran, so daß die Saponinkonzentration so gewählt werden kann, daß die Plasmamembran permeabilisiert ER und Organellen intakt bleiben (Fiskum, 1985).

Zum Permeabilisieren wurde eine T25-Flasche HEK-293-Zellen mit einer Konfluenz zwischen 80 und 90%, wie in Abschnitt 3.1.5 beschrieben, abgelöst, die Zellen pelletiert (500xg, 5 min, RT) und zweimal mit IZ-Puffer+ Ca^{2+} gewaschen (500xg, 5 min, RT). Anschließend wurden die Zellen in Permeabilisierungspuffer aufgenommen und für 5 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die permeabilisierten Zellen pelletiert (500xg, 5 min, RT), einmal mit IZ-Puffer, nominal Ca^{2+} -frei gewaschen und mit einer Dichte von $2 \cdot 10^7$ Zellen/ml in IZ-Puffer, nominal Ca^{2+} -frei aufgenommen. Zur Messung der Ca^{2+} -Konzentration wurden in einer 2 ml-Quarz-Küvette zu 1.5 ml der Suspension der permeabilisierten Zellen Fura-2 (freie Säure, Endkonzentration 1 μM), Creatinkinase (Endkonzentration: 20 U/ml) und Creatinphosphat (Endkonzentration: 20 mM) gegeben. Das Sedimentieren der Zellen wurde durch leichtes Rühren verhindert. Die Veränderungen in der Fura-2-Fluoreszenz wurden in einem Hitachi F-2000 Spektrofluorimeter verfolgt. Die Software des Fluorimeters zeichnete dabei in 5 s Intervallen die Emission bei 495 ± 10 nm nach wechselnder Anregung bei 340 ± 10 nm und 380 ± 10 nm auf.

Nach Zugabe von ATP (Endkonzentration: 1 mM) nahm die Ratio 340/380 als Folge der Beladung der Speicher und damit der Entnahme von Ca^{2+} aus dem extravesikulären Raum ab. Das System aus Creatinphosphat und Creatinkinase regeneriert das umgesetzte ATP. Nach dem sich ein Plateau eingestellt hatte, wurde durch schrittweise Zugabe von Ins-1,4,5- P_3 das Ca^{2+} aus den Speichern freigesetzt. Die Freisetzung des restlichen in den permeabilisierten Zellen aufgenommenen Ca^{2+} erfolgte durch Zugabe von 1 μM Ionomycin. Die Ca^{2+} -Konzentration wurde nach der Formel von Grynkiewicz et al. (1985) nach Kalibrierung mit 2 mM CaCl_2 für das maximale Ratio und 8 mM EGTA / 60 mM Tris für das minimale Ratio errechnet.

3.5.3 Fluorimetrische Bestimmung von Veränderungen des Potentials der Plasmamembran mit DiBAC4(3)

Bei DiBAC4(3) (Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe) handelt es sich um einen sogenannten 'slow response'-Indikator mit geringer zeitlicher Auflösung aber hoher Sensitivität, der sich besonders für die Messung langsamer Änderungen des Membranpotentials in nicht-erregbaren Zellen eignet (Epps et al., 1994). Die Messung des Membranpotentials mit DiBAC4(3) beruht darauf, daß sich Bisoxonole, zu denen DiBAC4(3) gehört, abhängig vom Membranpotential zwischen intra- und extrazellulärem Raum verteilen. Die Fluoreszenz von DiBAC4(3) verändert sich mit dem Proteingehalt der Lösung. Aus diesem Grund muß die Messung in einem proteinfreien Puffer durchgeführt werden, damit intrazelluläres DiBAC4(3) andere Fluoreszenzeigenschaften aufweist als extrazelluläres. Die erhobenen Daten wurden auf das Ruhemembran-Potential und die maximale Depolarisation mit $1 \mu\text{M}$ Gramicidin normiert und als Anteil der maximalen Depolarisation angegeben.

Für die Messung wurden HEK-293-Zellen mit einer Konfluenz zwischen 80 und 90%, wie unter 3.1.5 beschrieben, von der Kulturflasche abgelöst und in ECS+Ca²⁺-BSA in einer Dichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml aufgenommen. Die Veränderungen der DiBAC4(3)-Fluoreszenz wurde in einem Hitachi F-2000 Spektrofluorimeter verfolgt. In einer Quartzküvette wurde 1 ml der Zellsuspension mit 200 nM DiBAC4(3) versetzt und kontinuierlich gerührt. Die Anregung erfolgte bei 490 ± 10 nm, die Emission wurde bei 520 ± 10 nm gemessen. Anschließend wurde die Einstellung eines stabilen Basiswertes abgewartet und die eigentliche Messung gestartet. 200 s nach Start wurde der Stimulus zugegeben und weitere 600 s später $1 \mu\text{M}$ Gramicidin A (Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe). Nach Erreichen der maximalen Depolarisation wurde die Messung beendet.

3.5.4 Puffer & Lösungen

- Apamin: 1 mM in bidest Wasser
 - ATP: 50 mM ATP in IZ-Puffer, nominal Ca²⁺-frei
 - CaCl₂-Lösung: 250 mM CaCl₂ in bidest. Wasser
 - Creatinkinase: 5 mg/ml (entspricht 4000 U/ml bei 37°C) in IZ-Puffer, nominal Ca²⁺-frei
 - Creatinphosphat: 2 M in IZ-Puffer, nominal Ca²⁺-frei pH 7.2 (mit KOH)
 - DiBAC4(3): 100 mM DiBAC4(3) in DMSO
 - ECS-Ca²⁺(extrazelluläre Lösung ohne Ca²⁺): 15 mM HEPES pH 7.4 (mit NaOH); 140 mM NaCl; 5 mM KCl; 1 mM MgCl₂; 10 mM Glucose; 0.1% (w/v) BSA
 - ECS+Ca²⁺(extrazelluläre Lösung mit Ca²⁺): 15 mM HEPES pH 7.4 (mit NaOH); 140 mM NaCl; 5 mM KCl; 1 mM MgCl₂; 10 mM Glucose; 0.1% (w/v) BSA; 1.8 mM CaCl₂
-

- ECS+Ca²⁺-BSA (extrazelluläre Lösung mit Ca²⁺ ohne BSA): 15 mM HEPES pH 7.4 (mit NaOH); 140 mM NaCl; 5 mM KCl; 1 mM MgCl₂; 10 mM Glucose; 1.8 mM CaCl₂
- Fura-2/AM: 1 mg/ml Fura-2/AM in wasserfreiem DMSO
- Fura-2, freie Säure: 1 mg/ml in bidest. Wasser
- Gramicidin: 100 mM Gramicidin A in DMSO
- IZ-Puffer+Ca²⁺: 10 mM HEPES pH 7.2 (mit KOH); 120 mM KCl; 10 mM NaCl, 1.2 mM MgCl₂; 1 mM EGTA; 0.533 mM CaCl₂; freie Ca²⁺-Konzentration 170 nM (berechnet mit MaxChelator, [Patton et al. \(2004\)](#))
- IZ-Puffer, nominal Ca²⁺-frei: 10 mM HEPES pH 7.2 (mit KOH); 120 mM KCl; 10 mM NaCl, 1.2 mM MgCl₂ in bidest. Wasser (die freie Mg²⁺-Konzentration beträgt nach Zugabe von 1 mM ATP etwa 300 nM, berechnet mit MaxChelator, [Patton et al. \(2004\)](#))
- IZ-Puffer mit Cs⁺, nominal Ca²⁺-frei: 10 mM HEPES pH 7.2 (mit KOH); 120 mM CsCl; 10 mM NaCl, 1.2 mM MgCl₂ in bidest. Wasser
- Ionomycin: 1 mg/ml Ionomycin in DMSO
- Ins-1,4,5-P₃: 2 mM Ins-1,4,5-P₃ in bidest. Wasser
- Permeabilisierungspuffer: IZ-Puffer+Ca²⁺ mit 80 µg/ml Saponin
- Tris/EGTA-Lösung: 3 M Tris (pH 7.4 mit HCl); 400 mM EGTA

3.5.5 Geräte

- Fluoreszenz-Spektrophotometer Hitachi F-2000 (Colora Messtechnik, Lorch)
- Quarzküvetten 2 ml Volumen , 10 mm Schichtdicke (Hellma, Mühlheim/Baden)

3.6 Elektrophysiologie

3.6.1 Patch-clamp-Technik

Die von Neher und Sakman entwickelte Patch-clamp-Methode ermöglicht das Messen der Ströme durch die Membran einzelner Zellen und unter optimalen Bedingungen sogar der Ströme einzelner Ionenkanäle ([Hamill et al., 1981](#)).

Bei der Patch-clamp-Technik wird eine Glaskapillare mit einem Mündungsdurchmesser von etwa 1 µm in so engen Kontakt zur Membran der Zelle gebracht, daß der elektrische Widerstand zwischen einer Ag/AgCl-Elektrode im Innern der Kapillare und der umgebenden Lösung im GΩ-Bereich liegt (Gigaseal). Durch Anlegen von Unterdruck an die Patchpipette kann nun die Membran unter der Pipettenmündung eröffnet werden, was bei Erhalt des Gigaseal eine niederohmige elektrische Verbindung zum Zellinneren erlaubt (Ganzzelleableitung oder Whole-cell-Konfiguration, s. Abb [3.6.4](#)).

Legt man zwischen die Elektrode in der Kapillare und die Badelektrode eine Spannung, so fließt ein Strom über die Membran der Zelle. Dieser Strom hat einen Spannungsabfall über dem Widerstand der Zellmembran R_m zur Folge. Da der Sealwiderstand R_g sehr viel größer ist als der Membranwiderstand R_m , kann auf diese Weise die Membran der Zelle auf ein bestimmtes Potential V_m geklemmt werden. Ein geringer Serienwiderstand R_S erlaubt es, die Membran sehr schnell auf ein bestimmter Potential zu klemmen (unkompensierte Zeitkonstante der Umladung: $\tau = R_S \times C_m$). Um bei einem Spannungsklemmen-Experiment (auch Voltage clamp) die Spannung über der Zellmembran konstant zu halten, ist die Elektrode in der Pipette mit dem Eingang eines Differenzverstärkers verbunden, an dessen zweiten Eingang ein Kommandopotential (V_c) gelegt wird. Ein Unterschied zwischen V_m und V_c führt dazu, daß über den Rückkopplungswiderstand R_f ein Strom fließt, wodurch sich der Spannungsabfall über R_m und damit das Membranpotential V_m in Richtung auf das Kommandopotential V_c ändern. Das Signal am Ausgang des Verstärkers ist dem Klemmstrom proportional.

3.6.2 Messtand

Die Messapparatur war auf einem schwingungsgedämpften Tisch in einem geerdeten Faradaykäfig aufgebaut. In dem Faradaykäfig befand sich ein Axiovert Invers-Mikroskop (Zeiss, Jena) mit Phasenkontrast-Einrichtung und einer Lichtquelle. Der Kreuztisch des Mikroskops enthielt eine für 35 mm-Kulturschalen passende Halterung. Die direkt am Vorverstärker befestigte Pipette konnte durch einen Mikromanipulator mit Schrittmotoren bewegt werden. Um Schmutz von der Pipettenspitze fernzuhalten wurde ein leichter Überdruck auf die Pipette gegeben. Der Druck in der Pipette wurde über einen Schlauch und einen Dreiwegehahn angelegt, wobei zur Kontrolle des Drucks ein Manometer diente.

3.6.3 Pipetten und Elektroden

Die verwendeten Pipetten wurden aus Borosilikat-Glaskapillaren mit einem Durchmesser von 1.5 mm (GB 150 T, Science Products GmbH, Hofheim) mit Hilfe eines vertikal ziehenden Pullers am jeweiligen Messtag hergestellt. Nach Hitze-polierung wurde die Kapillare mit intrazellulärer Lösung befüllt und mit Sigmacote (Sigma, Deisenhofen) beschichtet. Die Pipette wurde in einen Elektrodenhalter mit BNC-Anschluß eingesetzt. Die Elektrode bestand aus einem Silberdraht, der mit einer AgCl-Schicht überzogen wurde, um eine Polarisierung der Elektrode zu verhindern. Der Widerstand der Patch-Pipette lag mit den verwendeten Lösungen im Bereich 3 – 6 M Ω . Als Referenzelektrode wurde eine Agarbrücke verwendet.

3.6.4 Verstärker und Messtechnik

Die vom Vorverstärker aufgenommenen Signale wurden an den Patch-clamp-Verstärker EPC-9 weitergegeben. Die Steuerung des Verstärkers und die Aufnahme der Daten erfolgte mit der Software PULSE (HEKA, Lamprecht). Pipettenkapazität C_p und Membrankapazität C_m wurden durch die dafür vorgesehenen Kompensationsmechanismen des Verstärkers mit schneller (C_{fast}) und langsamer Zeitkonstante (C_{slow}) kompensiert. Die Membrankapazitäten von HEK-293-Zellen lag typischerweise bei 15 – 20 pF, die der kleineren Jurkat-Zellen bei etwa 9 pF.

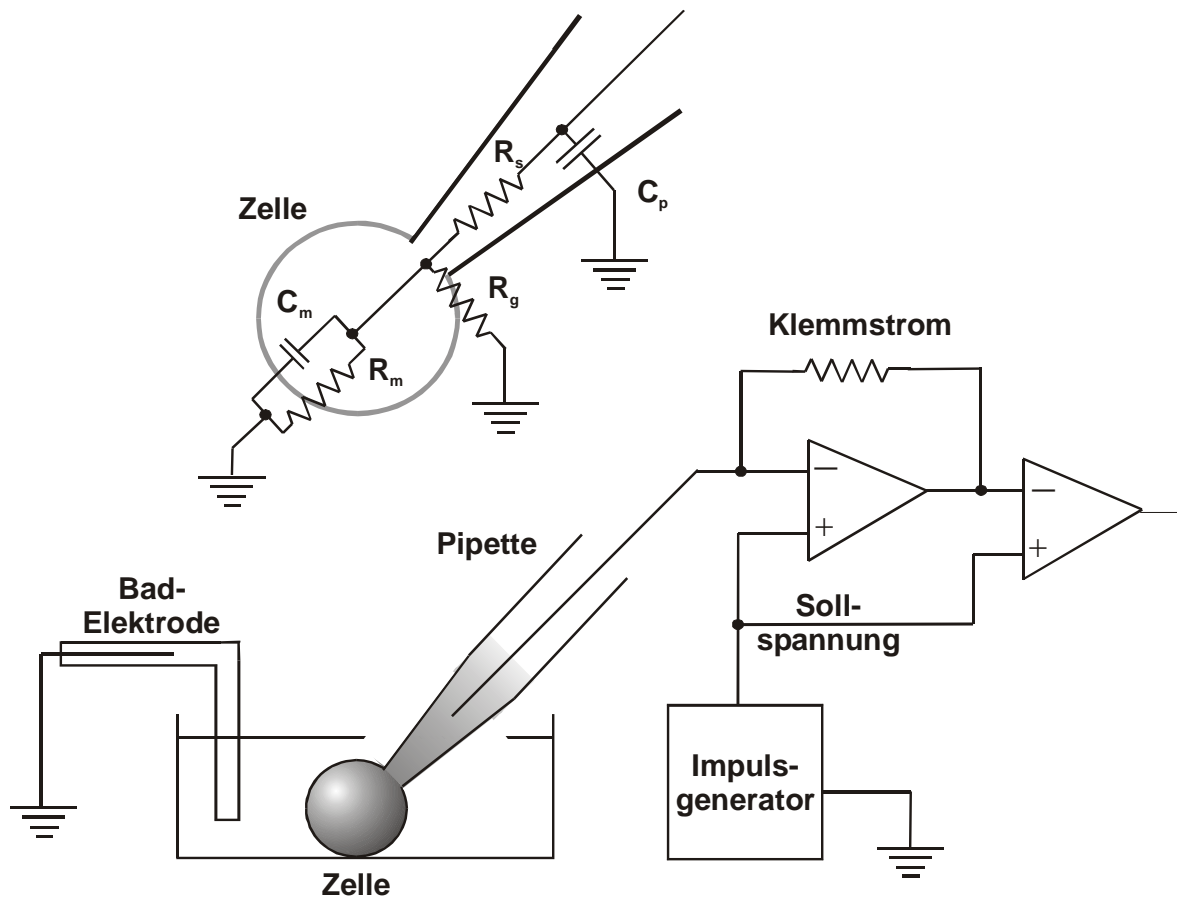


Abbildung 3.1: a) Ersatzschaltbild von Patch-Pipette und Zelle. Die passiven elektrischen Eigenschaften der Zellmembran sind als elektrische Bauelemente wiedergegeben. C_p Pipettenkapazität, C_m Membrankapazität, R_g Sealwiderstand, R_m Membranwiderstand, R_s Serienwiderstand. b) Schematische Darstellung eines Patch-clamp-Experiments in der whole-cell-Konfiguration. Der Verstärker sorgt über einen Regelkreis dafür, daß die Spannung mit Hilfe des Klemmstroms auf dem eingestellten Wert gehalten wird. Öffnen sich Ionenkanäle in der Zellmembran, so ändert sich der Klemmstrom proportional zum Strom durch die Ionenkanäle (verändert nach Gebauer (2003) und Hauber (2003)).

50 - 70 % des Serienwiderstandes wurden mit Hilfe der entsprechenden Funktion des Verstärkers kompensiert. Das analoge Messsignal wurde mit einer Frequenz von 10 kHz digitalisiert und zur weiteren Verarbeitung auf der Festplatte gespeichert. Für die Darstellung der Daten wurde eine nachträgliche Filterung mit 1 kHz durchgeführt.

3.6.5 Ganzzelleableitungen an HEK-293- und Jurkat-Zellen

Alle Experimente wurden als Ganzzelleableitung im Spannungsklemmen-Modus durchgeführt.

HEK-293-Zellen wurden am Tag vor dem Experiment, wie in Abschnitt 3.1.5 beschrieben, im Verhältnis 1:20 in 35 mm Kulturschalen umgesetzt. Die Zellen wurden vor dem Experiment zweimal mit extrazellulärer Lösung gewaschen und bei RT in extrazellulärer Lösung gemessen. Nach dem Durchbrechen in den Whole-cell-Modus wurden die Zellen bei -60 mV gehalten und alle 2 s wurde das Membranpotential in einer Rampe (250ms) von -120 mV bis +100 mV variiert.

Jurkat-Zellen wurden vor Beginn des Experiments zur Adhäsion für 5 min bei 37°C auf mit Poly-L-Lysin beschichteten 35 mm-Kulturschalen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen vor dem Experiment zweimal mit extrazellulärer Lösung gewaschen und bei RT in extrazellulärer Lösung gemessen. Nach dem Durchbrechen in den Whole-cell-Modus wurden die Zellen bei -60 mV gehalten und alle 20 s wurde das Membranpotential in einer Rampe (250ms) von -100 mV bis +100 mV variiert.

3.6.6 Puffer & Lösungen

- für HEK-293-Zellen:
 - Extrazelluläre Lösung: 156 mM NaCl; 5 mM CaCl₂; 10 mM Glucose; 10 mM HEPES (pH 7.4 mit NaOH)
 - Pipetten-Lösung: 156 mM CsCl; 1 mM MgCl₂; 10 mM HEPES (pH 7.2 mit NaOH); 10 mM EGTA; kein freies Ca²⁺
 - Pipetten-Lösung: 156 mM CsCl; 1 mM MgCl₂; 10 mM HEPES (pH 7.2 mit NaOH); 10 mM EGTA; 8.89 mM CaCl₂; freie Ca²⁺-Konzentration 10 μM (berechnet mit MaxChelator, [Patton et al. \(2004\)](#))
 - für JMP-Zellen:
 - Extrazelluläre Lösung: 145 mM NaCl; 2.8 mM KCl; 2 mM MgCl₂; 1 mM CaCl₂; 10 mM Glucose; 10 mM HEPES (pH 7.2 mit NaOH)
-

- Pipetten-Lösung: 145 mM Glutamat, Kalium-Salz; 8 mM NaCl; 1 mM MgCl₂; 10 mM EGTA; 3.34 mM CaCl₂; pH 7.2 (mit NaOH); freie Ca²⁺-Konzentration 100 nM (berechnet mit MaxChelator, [Patton et al. \(2004\)](#))

3.6.7 Geräte

- Computer Macintosh G3 (Apple) mit PULSE-Software (HEKA Elektronik, Lambrecht)
 - DMZ Puller (Zeitz-Instrumente, Augsburg)
 - Mikromanipulator (Luigs und Neumann, Ratingen)
 - Mikroskop Zeiss Axiovert 35 (Zeiss, Jena)
 - Patch-clamp-Verstärker EPC-9 (HEKA Elektronik, Lambrecht)
-

4 Ergebnisse

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit beschreibt die Klonierung verschiedener Splicevarianten des Ionenkanals TRPM4, die Bestimmung der subzellulären Lokalisation dieser Splicevarianten und deren funktionale Charakterisierung mit Hilfe fluorimetrischer und elektrophysiologischer Methoden. Der zweite Teil stellt elektrophysiologische Untersuchungen zur Pharmakologie des endogen in Jurkat T-Lymphozyten exprimierten Ionenkanals TRPM2 dar.

4.1 Analyse der Expression von TRPM4 in HEK-293-Zellen

Die Expression von TRPM4 in HEK293-Zellen wurden in Gesamt-RNA aus HEK-293-Zellen mittels RT-PCR untersucht. Es wurden zwei unterschiedliche RT-PCR-Reaktionen durchgeführt, eine gegen das 5'-Ende des Transkripts und eine gegen das 3'-Ende. Die dabei verwendeten Primer (s. Abb. 4.1) wurden so gewählt, daß die Amplifikate Bereiche der mRNA umfassen, für die alternatives Splicing beschrieben wurde (Launay et al., 2002; Xu et al., 2001).

Bei Untersuchung des 5'-Endes wurden zwei Amplifikate erhalten. Davon hatte eins eine Länge von 667 bp und entsprach dem konventionell gesplitten Transkript und das andere stellte mit 311 bp ein trunkiertes Transkript dar, in dem die Exons 3 und 4 durch alternatives Splicing deletiert waren. Dieses verkürzte Transkript kodierte für TRPM4a (s. Abb. 4.1 unten links). Daneben waren zwei deutlich schwächere Amplifikate zu erkennen, deren Identität nicht bestimmt wurde. Für das 3'-Ende wurden ebenfalls zwei Amplifikate erhalten, eins von 2133 bp, das dem konventionellen Transkript entsprach, und eins mit einer Länge von 1698 bp, das einem Transkript entsprach, in dem Exon 17 durch alternatives Splicing deletiert wurde. Das verkürzte Transkript kodierte für TRPM4c (s. Abb. 4.1 unten rechts). Über die Expression des vollständigen Transkripts für TRPM4b kann anhand der Ergebnisse der RT-PCR keine Aussage gemacht werden. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der RT-PCR-Experimente, daß in HEK-293-Zellen die Transkripte für TRPM4a und TRPM4c koexprimiert wurden.

Die Expression der Proteinprodukte der unterschiedlich gesplitten mRNAs wurde durch Präparation von Membranfraktionen und Western-Blot-Analyse mit einem affinitätsgereinigten Peptidantikörper gegen TRPM4 untersucht. Das Epitop, gegen das der Antikörper gerichtet war, lag dabei in einem Bereich, den die Proteinprodukte aller bekannten Splicevarianten enthalten. Die Unterscheidung der Proteinprodukte der unterschiedlich gesplitten mRNAs erfolgte auf Grund des Laufverhaltens in der Elektrophorese.

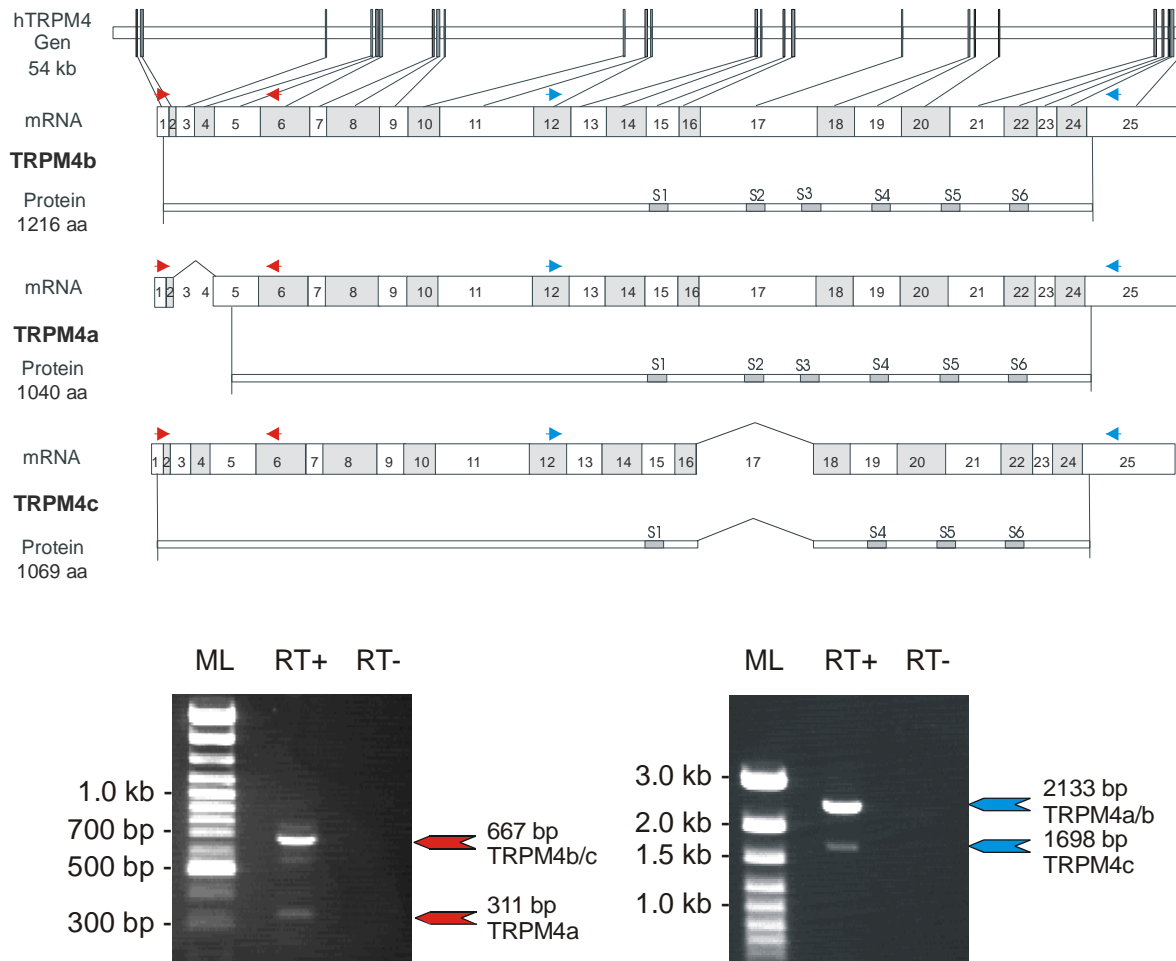


Abbildung 4.1: Splicing der Transkripte des humanen TRPM4-Gens und Analyse der Expression in HEK293-Zellen mittels RT-PCR. (A) Intron/Exon-Struktur des humanen TRPM4-Gens. Linien deuten das Splicing der Exons zum fertigen Transkript an. Es sind drei verschiedene Transkripte mit den von ihnen kodierten Proteinprodukten TRPM4a, TRPM4b und TRPM4c dargestellt. Die mit S1 bis S6 gekennzeichneten Bereiche zeigen die vorhergesagten Transmembran-Helices (siehe dazu Xu et al. (2001)). Die Pore wird mutmaßlich durch einen Bereich zwischen den Transmembran-Helices S5 und S6 gebildet. In TRPM4c fehlen die Transmembran-Helices S2 und S3. (B) Analyse der Expression von unterschiedlich gesplizten TRPM4-Transkripten in HEK293-Zellen mittels RT-PCR. Für die RT-PCR wurde Gesamt-RNA eingesetzt. Die Bindungstellen der jeweils verwendeten Primer sind in den Transkripten durch Pfeile in der entsprechenden Farbe gekennzeichnet. RT+ RT-PCR-Ansätze mit reverser Transkriptase, RT- Ansätze bei denen die Reverse Transkriptase hitzeinaktiviert wurde. ML Marker 100 bp ladder plus

TRPM4b ließe sich dabei auf Grund des Größenunterschiedes - 134 kDa gegenüber 116 kDa (TRPM4a) bzw. 119 kDa (TRPM4c) - von den beiden anderen Isoformen unterscheiden. Die Differenzierung zwischen TRPM4a und TRPM4c wäre hingegen schwierig. Als Positivkontrolle für die Westernblot-Experimente wurden Membranpräparationen aus TRPM4a und TRPM4b stabil überexprimierender HEK-293-Zelllinien verwendet (s. Abschnitt 4.3.1).

In der Membranfraktion aus wt-HEK293-Zellen konnte keine Expression des Proteins nachgewiesen werden (s. Abb. 4.8 b und Abb. 4.9 b). Dabei lag die Expression möglicherweise unterhalb des Detektionslimits der verwendeten Methode, weswegen eine geringe endogene Expression nicht vollkommen ausgeschlossen werden konnte.

Für TRPM4b zeigte die funktionelle Analyse im Patch-clamp-Experiment, daß wt-HEK-293-Zellen keine durch Ca^{2+} aktivierten Ströme mit der für Überexpression von TRPM4b publizierten Charakteristik besaßen (s. Abschnitt 4.3.2, Abb. 4.10). Damit stimmen die vorliegenden Ergebnisse mit denen von Nilius et al. (2003) überein. Diese sahen funktionell und im Northern-Blot ebenfalls keine Expression in HEK293-Zellen. Diese Zellen sind somit, obwohl in der RT-PCR für TRPM4 positiv, ein geeignetes System für die Untersuchung von TRPM4 durch Überexpression.

4.1.1 Klonierung der TRPM4a-cDNA aus HEK-293-Zellen

Die Synthese der cDNA mit dem gesamten kodierenden Bereich (CDS) für TRPM4a erfolgte in mehreren Schritten. Die Vorgehensweise bei der Klonierung ist in Abb. 4.2 schematisch dargestellt. Mit Hilfe des Primerpaars FLJ20041/1 und FLJ20041-3' wurde durch RT-PCR aus der Gesamt-RNA von HEK-293-Zellen ein 1.7 kb langes Fragment aus dem 5'-Bereich von TRPM4a und mit dem Primerpaar FLJ20041/2 und FLJ20041/rev 2 ein 2.5 kb langes Fragment aus dem 3'-Ende von TRPM4c amplifiziert. Beide Fragmente wurden durch TA-Klonierung in den Vektor pGEM-T easy eingebracht und vermehrt. Um aus den beiden Fragmenten die vollständige Protein-kodierende Sequenz (CDS) zu rekombinieren, wurde eine *Hind*III-Schnittstelle (Position 1350) genutzt, die sich in dem Bereich befand, in dem die beiden Fragmente überlappten.

Die Sequenzierung des Konstruktes zeigte, daß eine Mutation vorhanden war, die den Aminosäureaustausch Y53C zur Folge hatte. Die Mutation wurde durch QuikChange Mutagenese mit den Primern TRPM4/Mut A und TRPM4/Mut B revertiert. Zur Konstruktion der CDS von TRPM4a wurde das fehlende Exon 17 integriert. Dazu wurde zunächst per PCR ein Exon 17 umschließender Bereich aus humaner genomischer DNA amplifiziert. Das Amplicon wurde in pGEM-T easy kloniert und die Sequenz überprüft. Nach einem modifizierten QuikChange-Protokoll, das als Fusion-PCR bezeichnet wird, wurde Exon 17 in die cDNA von TRPM4a Δ 15 inseriert. Alle überprüften Klone wiesen Mutationen im Bereich der für die Insertion verwendeten Primer auf, die auf fehlerhafte Synthese der sehr langen Oligonukleotide zurückzuführen waren. Aus zwei Klone mit halbseitig korrekter Sequenz wurde

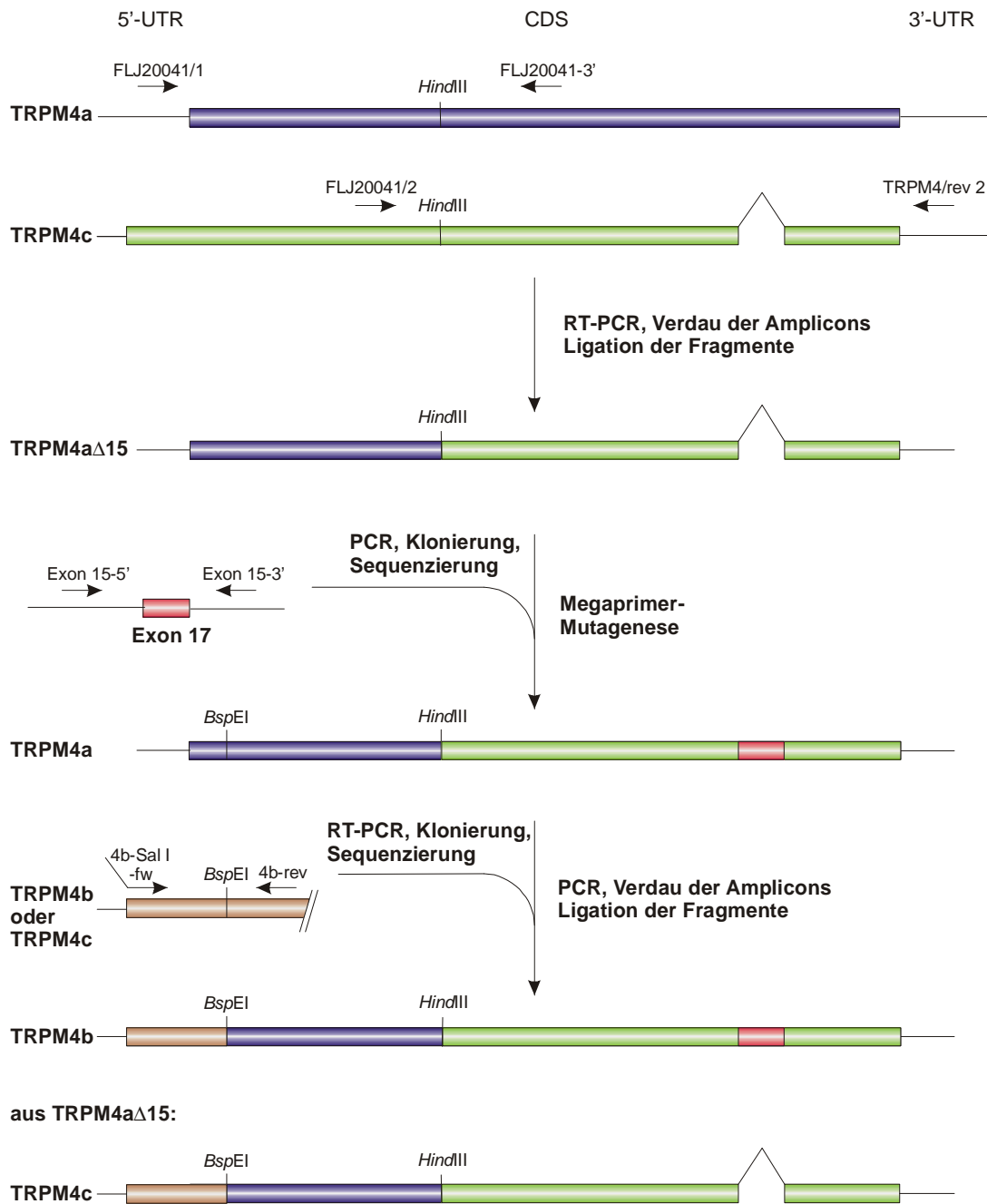


Abbildung 4.2: Klonierungsschema für das offene Leseraster unterschiedlich gesplitteter TRPM4-Transkripte. Aus Gesamt-RNA von HEK293-Zellen wurden zwei überlappende Fragmente aus dem 5'-Ende von TRPM4a und dem 3'-Ende von TRPM4c amplifiziert und über eine im Bereich der Überlappung befindliche HindIII-Schnittstelle rekombiniert. Das Konstrukt wurde als TRPM4a Δ 15 bezeichnet. Das fehlende Exon 17 wurde mit in den umliegenden Introns bindenden Primern aus humaner, genomischer DNA amplifiziert, kloniert und sequenziert. Anschließend wurde das Exon 17 mit einer PCR-basierten Megaprimer-Insertionsmutagenese in TRPM4a Δ 15 integriert. Auf diese Weise wurde das vollständige offene Leseraster von TRPM4a erhalten. Um zum offenen Leseraster von TRPM4b und TRPM4c zu kommen, wurde der 5'-Bereich dieser Transkripte mittels RT-PCR amplifiziert, kloniert, sequenziert und über eine BspEI-Schnittstelle mit den zuvor klonierten CDS von TRPM4a bzw. TRPM4a Δ 15 rekombiniert.

durch Rekombination über die in Exon 17 gelegene *XmaI* Schnittstelle ein Konstrukt der TRPM4a-CDS mit korrekter Sequenz generiert.

4.1.2 Konstruktion von Vektoren für die subzelluläre Lokalisation und funktionale Überexpression von TRPM4-Splicevarianten

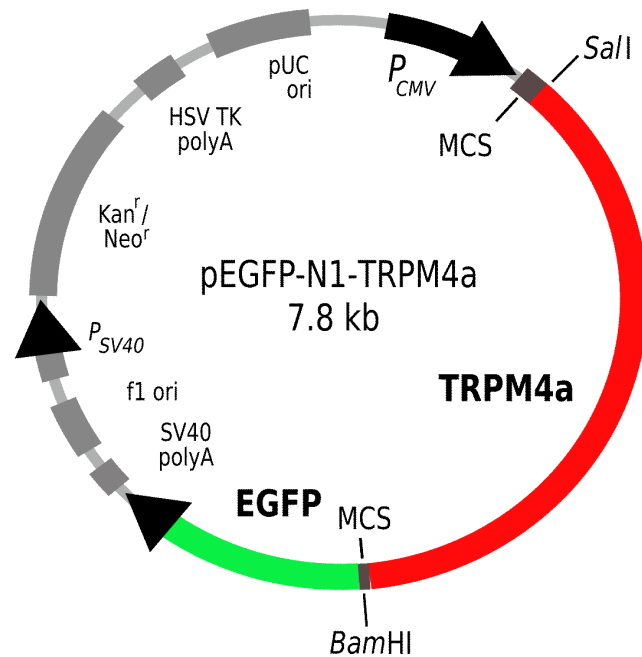
Während Ionenkanäle in der Plasmamembran für die Untersuchung mit der Patch-clamp-Methode gut geeignet sind, sind intrazellulär lokalisierte Ionenkanäle nur schwer zugänglich und müssen daher mit anderen Methoden untersucht werden. Darüber hinaus spielt beim Transport in die Plasmamembran häufig die Multimerisierung eine wichtige Rolle. Ist für den Zusammenbau zum funktionsfähigen Kanal ein Multimerisierungspartner erforderlich, der im untersuchten Zellsystem nicht exprimiert wird, so kann es zur Retardation im ER kommen. Die Lokalisation ist also ein wichtiger Parameter bei der funktionellen Charakterisierung eines Ionenkanals. Zu Beginn der Arbeit stand kein Antikörper gegen TRPM4 zur Verfügung. Aus diesem Grund wurden die Kanäle zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation als Fusionsprotein mit EGFP exprimiert.

Grundlage zur Konstruktion von Expressionsvektoren für Fusionsproteine aus TRPM4 und EGFP waren die beiden Vektoren pEGFP-N1 und pEGFP-C1. Zur Herstellung eines Vektors zur Expression von TRPM4a mit C-terminalem EGFP wurde mit Hilfe der Primer TRPM4/Sal/5'/N und TRPM4/Bam/3'/N das offene Leseraster von TRPM4a amplifiziert, die durch die Primer eingebrachten Restriktions-Schnittstellen wurden mit *SalI* und *BamHI* verdaut und das Amplikon über diese Schnittstellen in die MCS von pEGFP-N1 eingebaut. Der entstandene Vektor pEGFP-N1-TRPM4a enthielt, wie in Abb. 4.3 gezeigt, ein kurzes Stück des 5'-UTR, sowie die ursprüngliche Initiationssequenz von TRPM4a. Im exprimierten Fusionsprotein sind TRPM4a und EGFP über eine acht Aminosäuren lange Linker-Sequenz miteinander verbunden. Auf die gleiche Art und Weise wurde ausgehend von TRPM4a Δ 15 der Expressionsvektor pEGFP-N1-TRPM4a Δ 15 erzeugt.

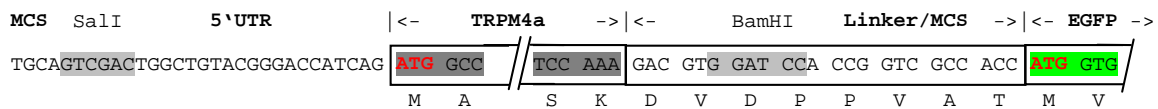
Um Vektoren für die Expression von TRPM4b und TRPM4c mit C-terminalem EGFP zu erhalten, wurde, wie im unteren Teil von Abb. 4.2 gezeigt, aus Gesamt-RNA von HEK293-Zellen ein Fragment des 5'-Endes von TRPM4b/c amplifiziert, in pGEM-T easy kloniert und mit Hilfe von *SalI* und *BspEI* in pEGFP-N1-TRPM4a bzw. pEGFP-N1-TRPM4 Δ 15 eingefügt. Wie pEGFP-N1-TRPM4a enthielten die Vektoren pEGFP-N1-TRPM4b und pEGFP-N1-TRPM4c ein Stück des 5'-UTR, sowie die ursprüngliche Initiationssequenz von TRPM4b/c. In den exprimierten Fusionsproteinen waren TRPM4b/c und EGFP ebenfalls über eine acht Aminosäuren lange Linker-Sequenz miteinander verbunden.

Zur Herstellung eines Vektors für die Expression von TRPM4a mit N-terminalem EGFP wurde mit Hilfe der Primer TRPM4/Sal/5'/C und pcDNA antisense das offene Leseraster von TRPM4a aus dem Vektor pcDNA3-TRPM4a amplifiziert, mit *SalI* und *BamHI* verdaut und über die entsprechenden Schnittstellen in die MCS von pEGFP-C1 eingebracht.

A



B



C

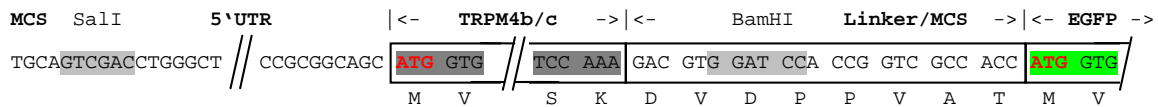
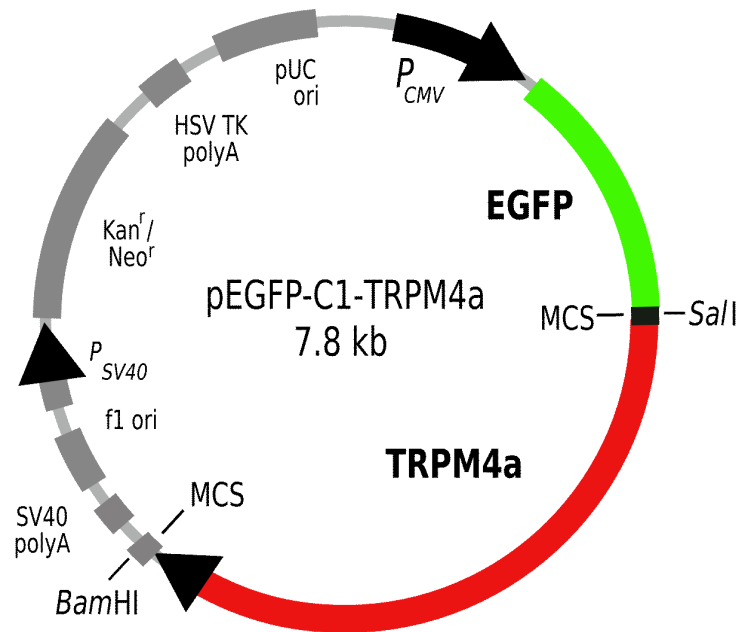


Abbildung 4.3: Vektoren für die Expression der TRPM4-Spliceformen als Fusionsprotein mit C-terminalem EGFP. (A) Die Vektoren basieren auf dem Vektor pEGFP-N1 der Fa. Clontech. (B) Zur Konstruktion von pEGFP-N1-TRPM4a wurde mit Hilfe der Primer TRPM4/Sal/5'/N und TRPM4/Bam/3'/N ein Bereich von TRPM4a amplifiziert, der die TRPM4a-kodierende Sequenz ohne das Stop-Codon umfasst. Nach Verdau mit *SalI* und *BamHI* wurde das Amplifikat in die MCS von pEGFP-N1 ligiert. (C) Für die Konstruktion von pEGFP-N1-TRPM4b und pEGFP-N1-TRPM4c wurde mit Hilfe der Primer 4b-SalI-fw und 4b-rev der fehlende Bereich amplifiziert und nach Verdau mit *SalI* und *BspEI* zwischen die MCS und die im N-terminalen Bereich von TRPM4a befindliche *BspEI*-Schnittstelle kloniert. Alle N-terminalen Fusionsproteine weisen einen acht Aminosäuren langen Linker zwischen TRPM4 und EGFP auf.

A



B

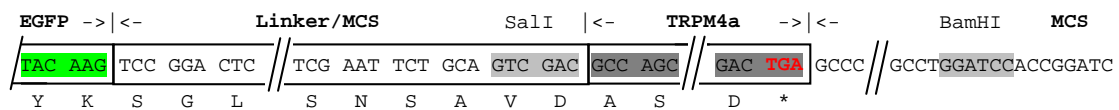


Abbildung 4.4: Vektor für die Expression von TRPM4a als Fusionsprotein mit N-terminalem EGFP. (A) Der Vektor basiert auf pEGFP-C1 der Fa. Clontech. (B) Zur Konstruktion von pEGFP-C1-TRPM4a wurde mit Hilfe der Primer TRPM4/Sal/5'/C und TRPM4/rev ein Bereich von TRPM4a amplifiziert, der die CDS ohne das Start-ATG umfasst. Nach Verdau mit *SalI* und *BamHI* wurde dieser in die MCS von pEGFP-C1 ligiert. Das C-terminale Fusionsprotein weist einen 15 Aminosäuren langen Linker zwischen EGFP und TRPM4a auf.

In pEGFP-C1-TRPM4a sind, wie in Abb. 4.4 zu sehen, EGFP und TRPM4a über eine neun Aminosäuren lange Linker-Sequenz miteinander verbunden. Das offene Leseraster wird durch die ursprüngliche Stop-Sequenz von TRPM4a abgeschlossen. Für die Generierung stabiler Zelllinien wurden von den pEGFP-N1-TRPM4-Vektoren ausgehend Vektoren konstruiert, die TRPM4 ohne EGFP exprimierten. Dies war notwendig, weil (i) EGFP mit der fluorimetrischen Ca^{2+} -Messung mit Fura2 interferiert und (ii) ein Einfluß von EGFP auf die Funktion des Ionenkanals nicht ausgeschlossen werden konnte. Ein Bereich zwischen dem 3'-Ende der CDS von TRPM4 und der Polyadenylierungsstelle wurde mit *AscI* und *XbaI* herausgeschnitten und durch einen Bereich aus pcDNA-TRPM4a ersetzt, der das ursprüngliche Stop-Codon enthielt und der ebenfalls zwischen einer *AscI* und einer *XbaI*-Schnittstelle lag. Um die Vek-

toren mit *XbaI* schneiden zu können, mußten diese zuvor in dem Bakterien-Stamm SCS110 amplifiziert werden, da *XbaI* durch überlappende dam-Methylierung blockiert wird.

Die entstandenen Expressionsvektoren waren mit Größen von 7.4 kb (pTRPM4a) und 7.9kb (pTRPM4b) verhältnismäßig klein, da sie eine gemeinsame Resistenzkassette für die Selektion in Pro- und Eukaryonten nutzen.

4.2 Lokalisation von TRPM4-Splicevarianten durch Expression als EGFP-Fusionsprotein in eukaryotischen Zelllinien

Zur Untersuchung der Lokalisation von TRPM4-Splicevarianten wurden die eukaryontischen Zelllinien HEK-293, COS-7 und CHO mittels Calciumphosphat-Präzipitation mit Expressionsvektoren für EGFP-Fusionsproteine der Kanäle transfiziert. Zum Vergleich wurden Zellen mit den Lokalisationsvektoren für die Plasmamembran (pEGFP-Mem) und das endoplasmatische Retikulum (pEGFP-ER) transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden 24 bis 72 h nach Transfektion fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

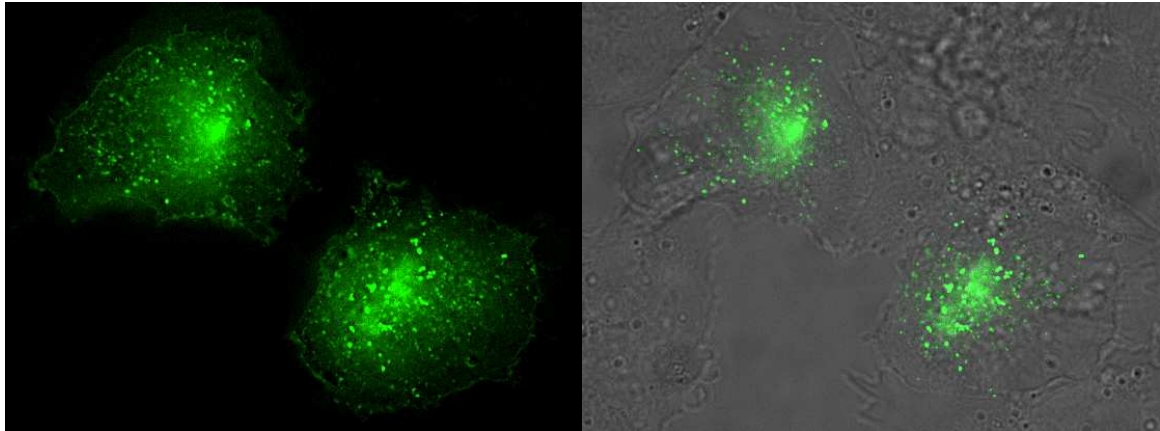
4.2.1 TRPM4b ist in der Plasmamembran lokalisiert

Die mit den Expressionsvektor pEGFP-N1-TRPM4b transfizierten Zellen zeigten eine schwache Färbung der Plasmamembran, sowie kleinerer, punktförmiger Strukturen im Cytoplasma. In einigen Zellen war darüber hinaus die Färbung einer kappenartig auf dem Kern aufsitzenden Struktur zu beobachten, dies ist besonders gut in Abb. 4.5 b zu erkennen. Der Vergleich mit Publikationen in denen Transportstrukturen der Zelle gefärbt bzw. per Video-Mikroskopie an vitalen Zellen verfolgt wurden (Alberts et al., 2002; Hirschberg et al., 1998), legt die Vermutung nahe, daß es sich bei den beobachteten Strukturen um Golgi-Apparat und Transportvesikel vom trans-Golgi zur Plasmamembran handelte.

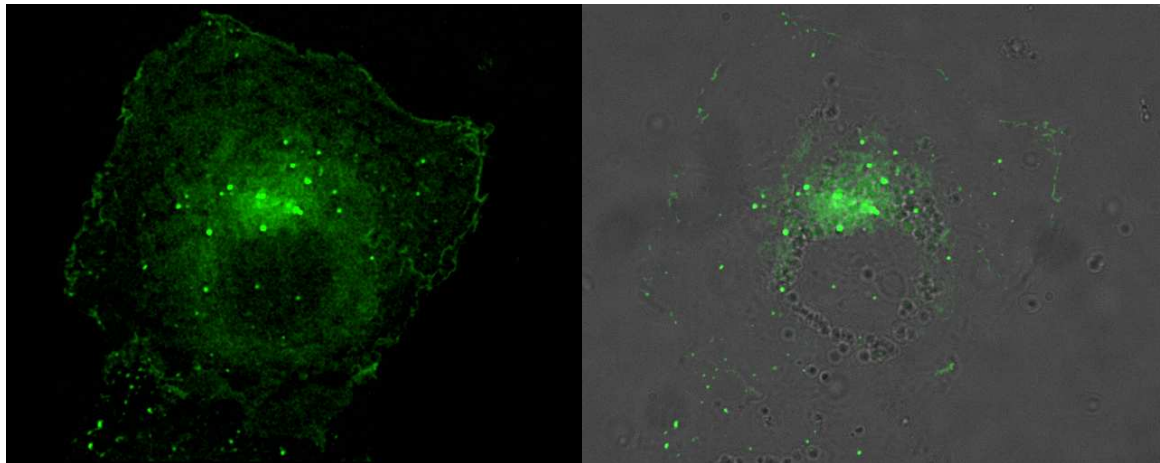
4.2.2 TRPM4a und TRPM4c werden im Endomembransystem zurückgehalten

Die mit den Expressionsvektor pEGFP-N1-TRPM4a (s. Abb. 4.6 b+c) bzw. pEGFP-C1-TRPM4a (s. Abb. 4.6 a) transfizierten Zellen zeigten eine deutliche Färbung der Kernhülle, sowie retikulärer Strukturen innerhalb des Cytoplasma. Der Vergleich mit den mit den Lokalisations-Vektoren pEGFP-ER (s. Abb. 4.6 d) und pEGFP-Mem (s. Abb. 4.6 e) transfizierten Zellen legt die Vermutung nahe, daß es sich bei diesen Strukturen um das endoplasmatische Retikulum der Zellen handelt.

a) CHO-Zellen mit pGFP-N1-TRPM4b



b) COS-7-Zellen mit pGFP-N1-TRPM4b



c) HEK293-Zellen mit pGFP-N1-TRPM4b

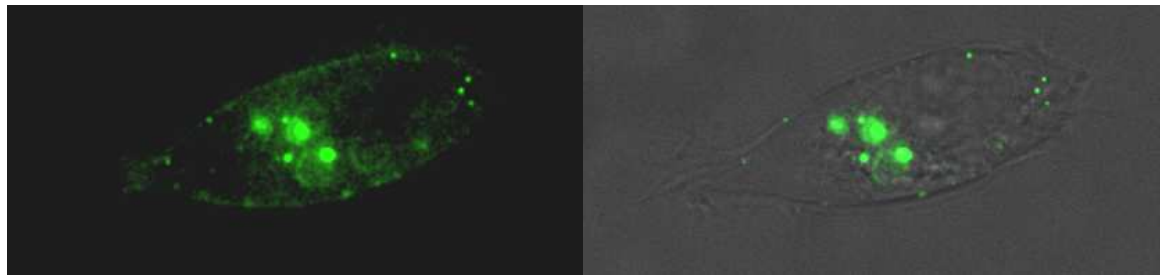
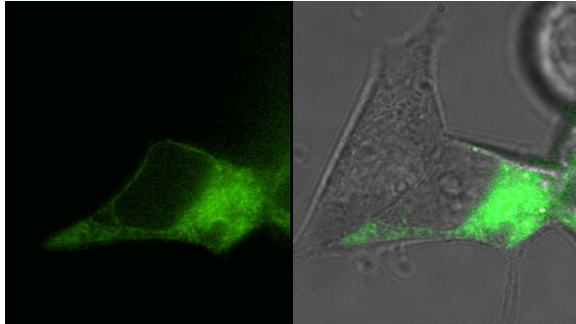
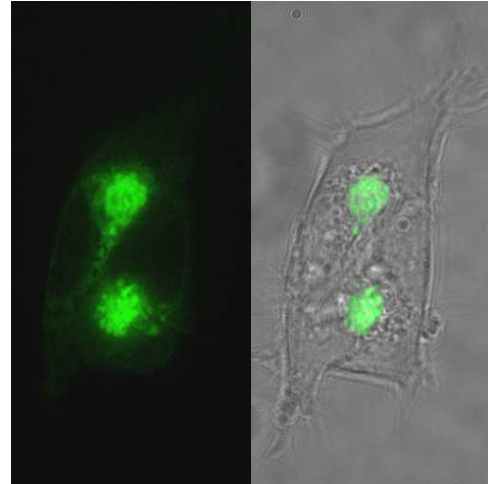


Abbildung 4.5: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der subzellulären Lokalisation von TRPM4b in Zellen, die transient N-terminale TRPM4b-EGFP-Fusionsproteine exprimieren. CHO- (a) und COS-7-Zellen (b) wurden mit pEGFP-N1-TRPM4b transfiziert und nach 24-48 h fluoreszenzmikroskopisch untersucht. HEK293-Zellen wurden transient mit pEGFP-N1-TRPM4b (c) transfiziert und nach 24-72 h fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Man sieht in den TRPM4b-EGFP exprimierenden Zellen eine schwache Färbung der Plasmamembran, am besten in den sehr großen und stark gespreiteten COS-7-Zellen zu erkennen. Darüber hinaus sind Vesikel zu erkennen, bei denen es sich vermutlich um Transportvesikel zwischen den zellulären Kompartimenten handelt. In den COS-7- aber auch in den CHO-Zellen erkennt man eine intensiv leuchtende Struktur in der Nähe des Kerns, bei der es sich um den Golgi-Apparat handelt, der in diesen Zellen häufig in Kernnähe lokalisiert ist.

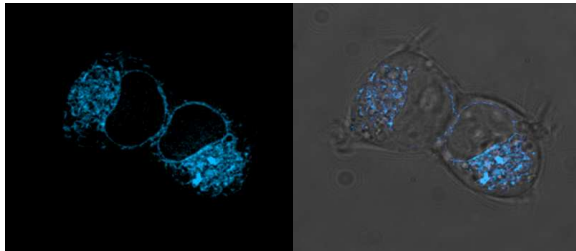
a) HEK293 mit pEGFP-C1-TRPM4a



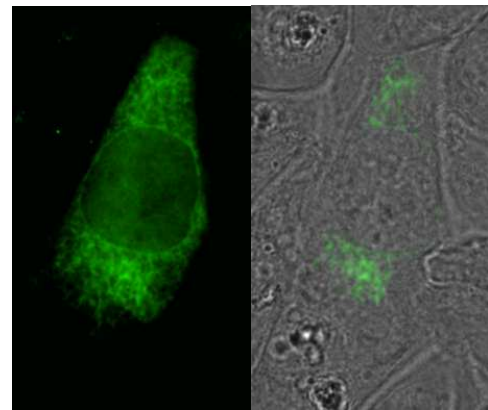
b) HEK293 mit pEGFP-N1-TRPM4a



d) HEK293 mit pECFP-ER



c) CHO mit pEGFP-N1-TRPM4a



e) HEK293 mit pECFP-Mem

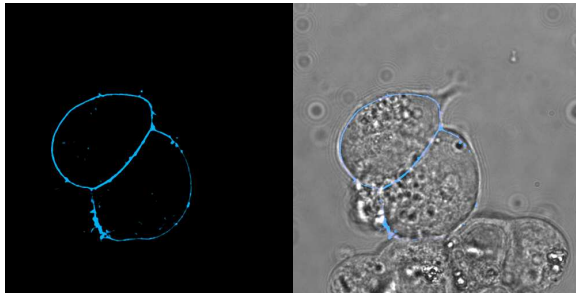


Abbildung 4.6: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der subzellulären Lokalisation von TRPM4a in Zellen die transient N- oder C-terminale TRPM4a-EGFP-Fusionsproteine exprimieren. HEK293-Zellen wurden transient mit pEGFP-C1-TRPM4a (a) oder pEGFP-N1-TRPM4a (b) transfiziert und nach 24 – 72 h fluoreszenzmikroskopisch untersucht. CHO-Zellen wurden mit pEGFP-N1-TRPM4a (c) transfiziert und nach 24 – 48 h fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Zum Vergleich sind HEK293-Zellen dargestellt, die mit zwei kommerziellen Lokalisationsvektoren transfiziert wurden, die ECFP-Varianten kodieren, die entweder das ER (pECFP-ER, d) oder die Plasmamembran (pECFP-Mem, e) markieren. Man sieht in den TRPM4a-EGFP exprimierenden HEK293 und CHO-Zellen eine deutliche Färbung der Kernhülle, sowie einer retikulären Struktur im Cytoplasma, die mit der Färbung des ER in den pECFP-ER transfizierten Zellen vergleichbar ist. Die Lokalisation ist unabhängig davon, ob es sich um ein N- oder C-terminales Fusionsprotein handelt.

4.3 Funktionelle Überexpression von TRPM4 in HEK-293-Zellen

4.3.1 Generierung stabiler Zelllinien und Nachweis der Expression

Zur funktionellen Analyse wurden stabile HEK-293-Klone generiert, die entweder TRPM4a oder TRPM4b stabil überexprimieren. HEK-293-Zellen wurden mittels Calciumphosphat-Präzipitation mit den Vektoren pTRPM4a, pTRPM4b bzw. pTRPM4c transfiziert. Die Zellen wurden anschließend mit dem Antibiotikum Geneticin selektioniert. Nach zwei Wochen konnte davon ausgegangen werden, daß Zellen mit episomalem Vektor diesen verloren haben. Alle verbliebenen Antibiotika-resistenten Zellen hatten den Vektor in das Genom integriert. Mittels Limiting Dilution wurden aus der selektionierten Kultur zelluläre Klone gewonnen.

Die so erhaltenen Klone wurden in zwei Schritten auf die Expression von exogenem TRPM4 untersucht. Im ersten Schritt wurde aus jeweils neun Klonen pro Splice-Variante Gesamt-RNA isoliert und mittels RT-PCR auf die Expression des rekombinanten Transkripts untersucht. Wie in Abb. 4.7 gezeigt, band der vorwärts-Primer innerhalb des offenen Leserasters von TRPM4, während der rückwärts-Primer nach dem Stop-Codon, in einem Bereich des Transkripts band, der aus dem Vektor stammte. Auf diese Weise wurden nur Transkripte des rekombinanten TRPM4, nicht jedoch endogene Transkripte amplifiziert. Aus den Klonen mit Expression des Transkripts wurden anschließend Membranprotein-Fractionen präpariert. Die Membranpräparationen wurden mittels Westernblot-Analyse mit einem affinitätsgereinigten Antikörper auf die Expression des Proteins untersucht.

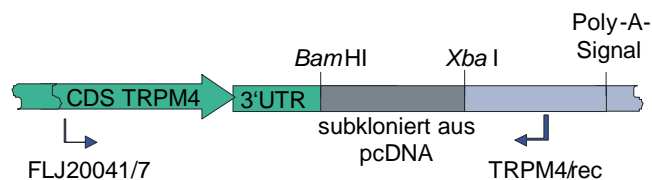
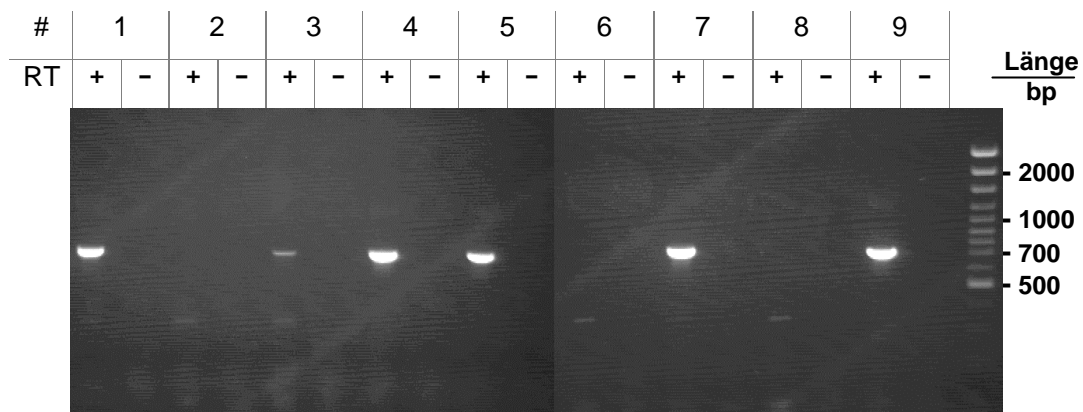


Abbildung 4.7: Unterscheidung zwischen überexprimierten TRPM4-Transkripten und endogenen Transkripten in der RT-PCR. Die von den pTRPM4-Vektoren transkribierten mRNAs unterschieden sich von endogenen Transkripten durch einen nicht translatierten Bereich zwischen der 3'-UTR von TRPM4 und dem Poly-A-Ende, der aus einem subklonierten Anteil des Vektors pcDNA3 und einem Teil des Ausgangsvektor pEGFP-N1 bestand. Um bei der Analyse der Klone aus der limiting Dilution zwischen endogenen und überexprimierten Transkripten zu unterscheiden, wurde der reverse-Primer TRPM4/rec so gewählt, daß er gegen diesen Bereich gerichtet war.

Sechs der neun analysierten pTRPM4b-transfizierten Klone bildeten das rekombinante Transkript. In drei dieser Klone gelang im Western-Blot der Nachweis der Proteinexpression (s. Abb 4.8). Insgesamt wurden drei stabile HEK-293-Zellklone mit unterschiedlich hoher TRPM4b-Expression erhalten. Im Gegensatz zu der von Launay et al. (2002) generierten,

Tetracyclin-induzierbaren Zelllinie, die TRPM4b mit Flag-Tag exprimiert, exprimieren diese permanent TRPM4b, das in der Primärstruktur mit nativem TRPM4b identisch ist. Von den analysierten pTRPM4a-transfizierten Klonen haben ebenfalls sechs von neun das rekombinante Transkript gebildet. Im Westernblot konnte die Proteinexpression für vier dieser Klone nachgewiesen werden (s. Abb 4.9).

a) RT-PCR



b) Western-Blot

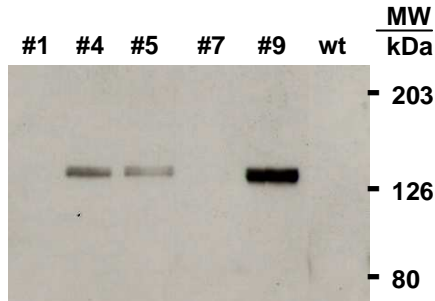
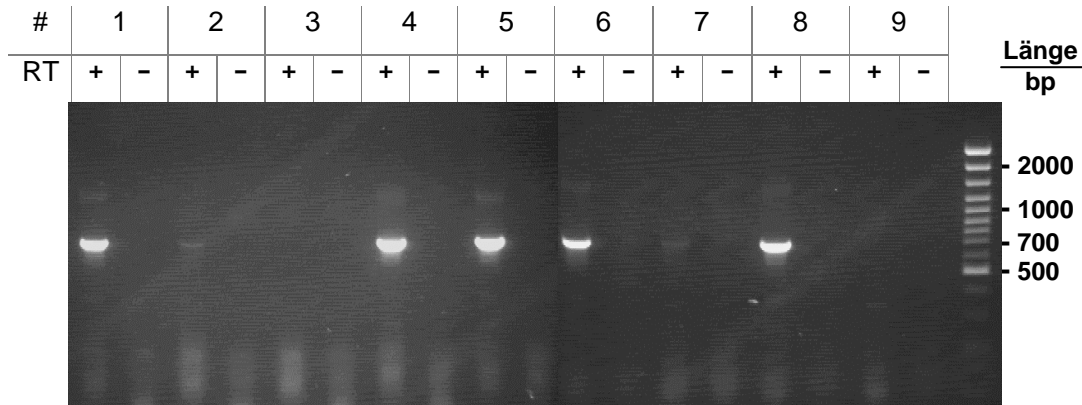


Abbildung 4.8: Nachweis der Überexpression von TRPM4b in klonalen HEK-293-Zellen durch RT-PCR und Western-Blot. Neun der aus der limiting Dilution der mit pTRPM4b transfizierten HEK-293-Zellen hervorgegangene Klone wurden durch RT-PCR auf die Expression des exogenen TRPM4b-Transkripts analysiert. Fünf der in der RT-PCR-positiven Klone wurden im Western-Blot mit dem affinitätsgereinigten TRPM4-Antikörper auf die Expression des Proteins untersucht. Das errechnete Molekulargewicht für TRPM4b beträgt 134,4 kDa. Drei der untersuchten Klone exprimieren TRPM4b als Protein in unterschiedlicher Höhe und wurden funktionell analysiert. TRPM4b#9 zeigt dabei die höchste Expression.

Es wurden somit insgesamt vier TRPM4a-exprimierende HEK-293-Zellklone mit unterschiedlich hoher Expression erhalten. In der Literatur ist bislang keine Zelllinie mit stabiler TRPM4a-Überexpression beschrieben worden. Darüber hinaus wurden neun pTRPM4c-

a) RT-PCR



b) Western-Blot

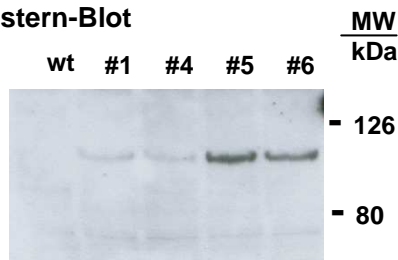


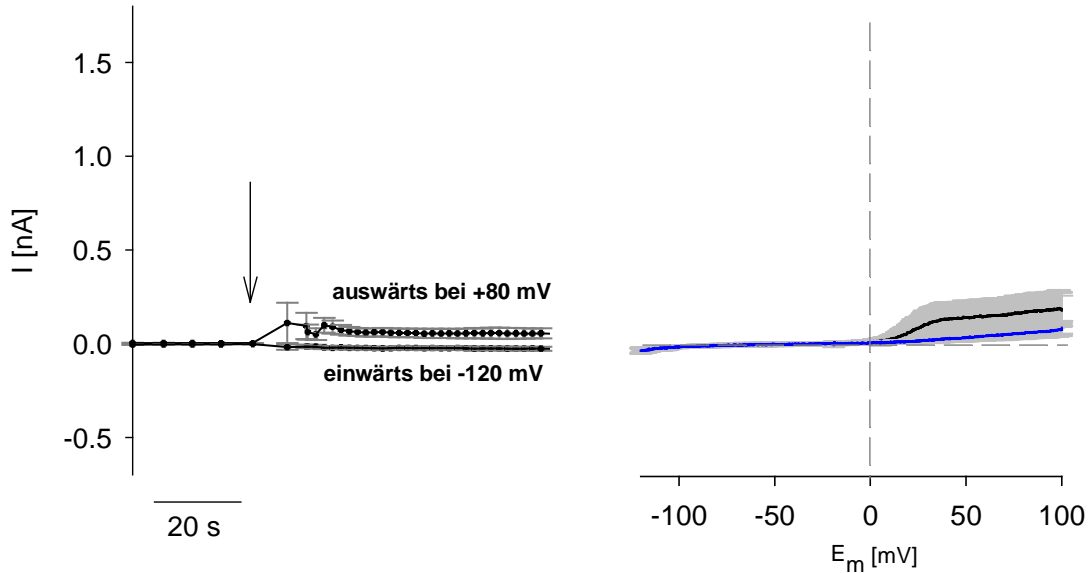
Abbildung 4.9: Nachweis der Überexpression von TRPM4a in klonalen HEK-293-Zellen durch RT-PCR und Western-Blot. Neun der aus der limiting Dilution der mit pTRPM4b transfizierten HEK-293-Zellen hervorgegangenen Klone wurden durch RT-PCR auf die Expression des exogenen TRPM4a-Transkripts analysiert. Vier der in der RT-PCR-positiven Klone wurden im Western-Blot mit dem affinitätsgereinigten TRPM4-Antikörper auf die Expression des Proteins untersucht. Das errechnete Molekulargewicht für TRPM4b beträgt 115.7 kDa. Alle Klone exprimieren TRPM4b als Protein in unterschiedlicher Höhe, TRPM4b#5 zeigt dabei die höchste Expression.

transfizierte Klone untersucht. Vier dieser Klone waren in der RT-PCR für das rekombinante Transkript positiv. Es konnte jedoch in keiner dieser Zelllinien eine konsistente Expression des Proteins nachgewiesen werden. Somit wurden die Untersuchungen zur Funktion auf TRPM4a und TRPM4b beschränkt.

4.3.2 Ca²⁺ aktiviert transiente, nicht-selektive Kationenströme in TRPM4b überexprimierenden HEK-293-Zellen

Die funktionale Expression von TRPM4b in der Membran von HEK-293-Klon TRPM4b#9 wurde durch Patch-clamp-Experimente als Ganzzelleableitung untersucht. Nilius et al. (2003) haben beschrieben, daß die durch Ca²⁺ aktivierten Ströme transient sind. Bereits nach 30 Sekunden ist in einem großen Teil der Zellen der Strom vollständig inaktiviert.

a) ohne freies Ca^{2+} in der Patch-Pipette



b) mit 10 μM freiem Ca^{2+} in der Patch-Pipette

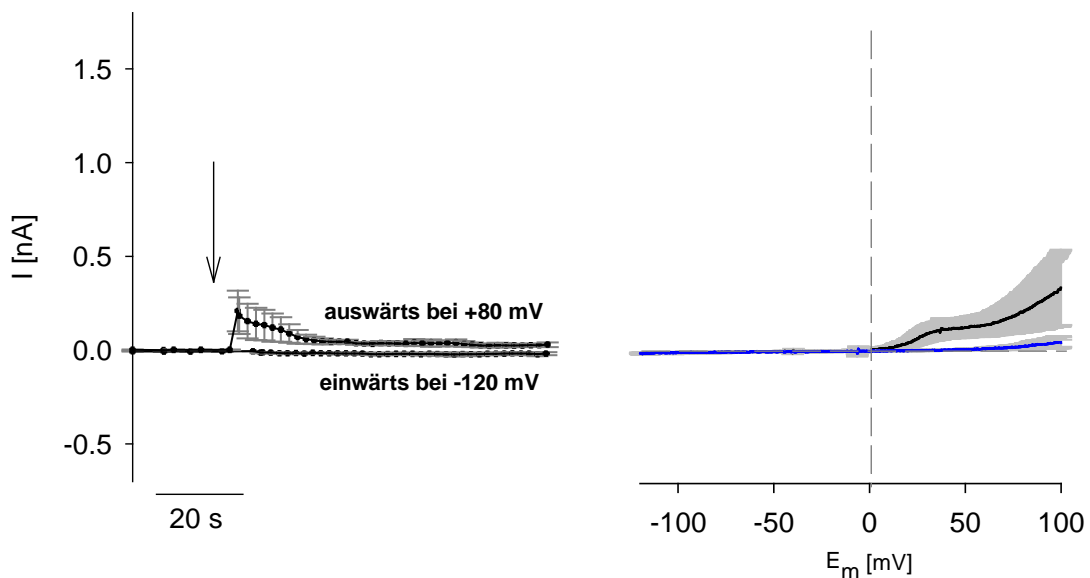
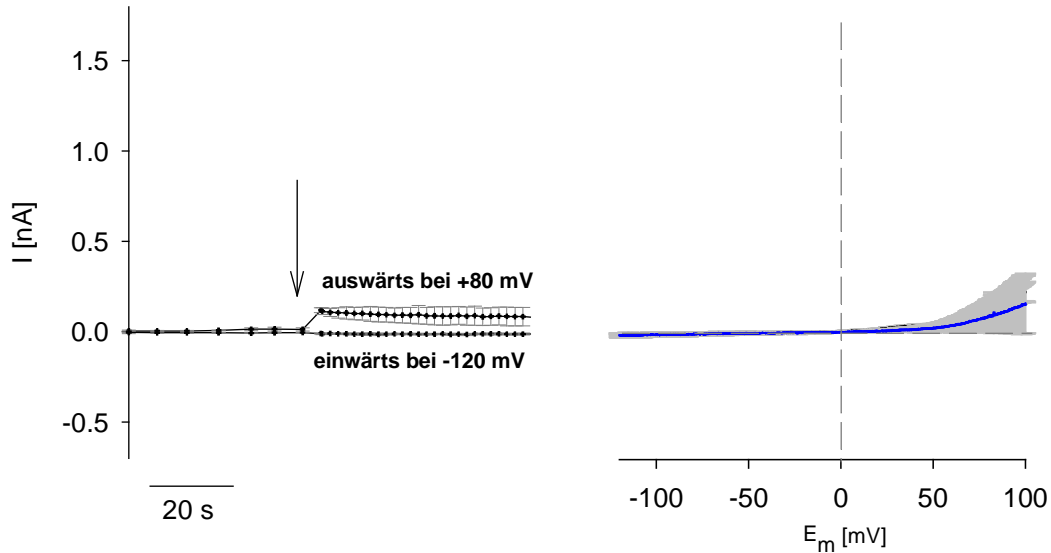


Abbildung 4.10: In Wildtyp HEK-293-Zellen aktiviert Ca^{2+} keinen Strom mit der Charakteristik des überexprimierten TRPM4b. Eine mögliche endogene Expression und Aktivierung von TRPM4b in Wildtyp HEK-293-Zellen wurde mit Hilfe der Patch-clamp-Technik untersucht. Die Experimente wurden als Ganzzelleableitung im Spannungsklemmen-Modus durchgeführt. Auf der linken Seite ist die zeitliche Entwicklung des Stroms bei +80 mV und -120 mV nach Durchbrechen in die Zelle zu sehen, während auf der rechten Seite IV-Diagramme (aus repetitiven Spannungsrampen von -120 mV bis +100 mV alle 2 s) nach maximaler Aktivierung des Stroms (schwarz) und 100 s nach Zugriff auf die Zelle (blau) dargestellt sind. Sowohl mit als auch ohne freies Ca^{2+} in der Pipette konnten lediglich endogene K_V -Ströme beobachtet werden. Es wurden keine zusätzlichen Ströme aktiviert (obere Zeile ohne freies Ca^{2+} , untere Zeile mit 10 μM freiem Ca^{2+} , beide $n=3$).

a) ohne freies Ca^{2+} in der Patch-Pipette



b) mit $10 \mu\text{M}$ freiem Ca^{2+} in der Patch-Pipette

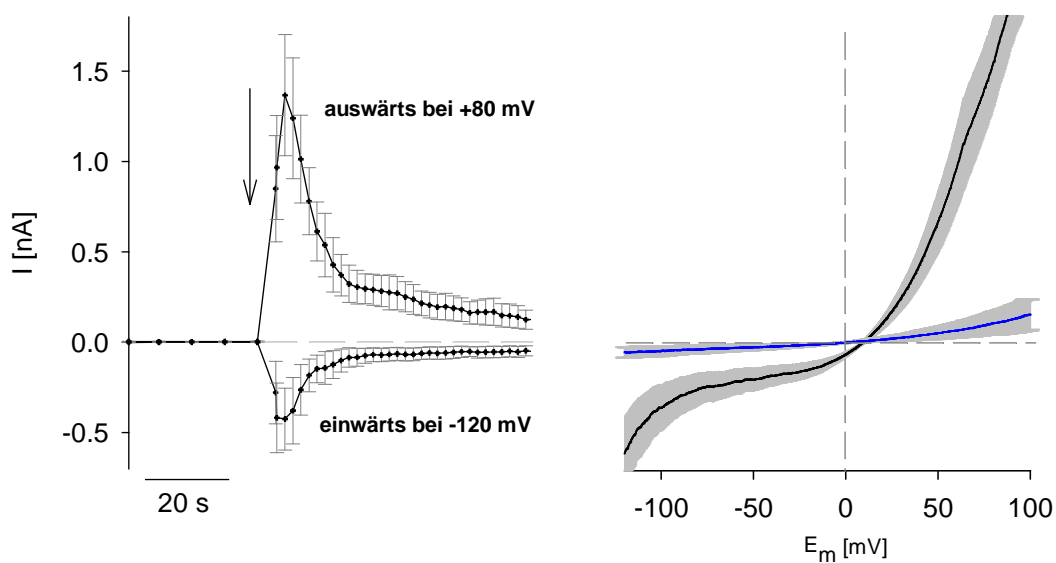


Abbildung 4.11: Aktivierung transienter, nicht-selektiver Kationenströme durch Ca^{2+} in TRPM4b überexprimierenden HEK-293-Zellen. Die Expression und Aktivierung von TRPM4b in dem pTRPM4b-transfizierten HEK-293-Klon #9 wurde in einem Patch-clamp-Experiment untersucht. Die Experimente wurden als Ganzzellaufleitung im Spannungsklemmen-Modus durchgeführt. Auf der linken Seite ist die zeitliche Entwicklung des Stroms bei +80 mV (auswärts) und -120 mV (einwärts) nach Durchbrechen in die Zelle zu sehen, während auf der rechten Seite IV-Diagramme aus Spannungsrampen von -120 mV bis +100 mV nach maximaler Aktivierung des Stroms (schwarz) und 100 s nach Zugriff auf die Zelle (blau) dargestellt sind. Ohne freies Ca^{2+} in der Pipette wurden keine nennenswerten Ströme aktiviert (obere Zeile, $n=2$), mit $10 \mu\text{M}$ freiem Ca^{2+} in der Pipette kommt es zur Aktivierung eines transienten, nicht-selektiven Kationenstroms mit einem Umkehrpotential nahe 0 mV und einer auswärtsgerichteten Charakteristik (untere Zeile, $n=6$).

Daher wurde, da keine Apparatur zur internen Perfusion zur Verfügung stand, nicht wie üblich zunächst der 'cell attached'-Mode hergestellt, in den Ganzzell-Modus durchgebrochen, dann die Einstellungen für die Kompensation der Kapazitäten und des Serienwiderstands vorgenommen und anschließend mit der eigentlichen Messung begonnen, sondern stattdessen das Programm für die Messung so eingestellt, daß vor jeder Spannungsrampe eine automatische Kompensation erfolgte. Nach Herstellen des 'cell attached'-Modus wurde mit der Messung begonnen und nach einigen Spannungsrampen in den Ganzzell-Modus durchgebrochen. Im Moment des Durchbrechens wurden aus der Pipette $10 \mu\text{M Ca}^{2+}$ in die Zelle infundiert.

Wie in Abb. 4.10 zu erkennen zeigen Wildtyp HEK-293-Zellen lediglich endogene K_V -Ströme (Yu und Kerchner, 1998; Jiang et al., 2002; Varghese et al., 2005). Wie von Nilius et al. (2003) beschrieben und im Gegensatz zu den Ergebnissen von Launay et al. (2002) zeigen Wildtyp HEK-293-Zellen keine endogenen Ca^{2+} -aktivierten Ströme mit der Charakteristik von TRPM4b. In dem untersuchten Klon 4b#9 aktivierten $10 \mu\text{M Ca}^{2+}$ in der Patch-Pipette einen nichtselektiven Kationenstrom mit einem Umkehrpotential nahe 0 mV und einer auswärtsgleichrichtenden Charakteristik (s. Abb. 4.11). Die Aktivierung ist transient und bereits 100 s nach Durchbruch in den Ganzzell-Modus ist kein nennenswerter Strom mehr nachweisbar. Die Ergebnisse zeigen die Expression von TRPM4b in der Plasmamembran der untersuchten Zellen.

4.3.3 Überexpression von TRPM4b führt zu einer Verstärkung des Ca^{2+} -Einstroms nach Ionomycin

Ionomycin hat abhängig von der eingesetzten Konzentration unterschiedliche Effekte auf Zellen. Während niedrige Konzentrationen (bis $1 \mu\text{M}$) eine Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher herbeiführen und lediglich sekundär über SOC/CRAC einen Ca^{2+} -Einstrom verursachen, wirken höhere Konzentrationen auch auf die Plasmamembran und bewirken einen direkten Einstrom von Ca^{2+} .

Der Einfluß der Expression von TRPM4b auf das durch Ionomycin verursachte Ca^{2+} -Signal wurde fluorimetrisch mit dem ratiometrischen Ca^{2+} -Indikator Fura-2 untersucht. Dabei wurde das 'Ca²⁺-free/Ca²⁺-readdition'-Protokoll verwendet, mit dem die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern und der Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran zeitlich separiert und somit getrennt voneinander untersucht werden können.

Die Ca^{2+} -Freisetzung im TRPM4b-exprimierenden Klon #9 war gegenüber den Wildtyp-Zellen nicht signifikant verändert. Da sich auch die Ca^{2+} -Konzentration vor Stimulation nicht signifikant von den Wildtyp-Zellen unterschied, war der Inhalt der mobilisierbaren Ca^{2+} -Speicher in Klon# 9 gegenüber den Wildtypen nicht verändert. Nachdem die Ca^{2+} -Konzentration in den Zellen wieder auf den Ruhewert abgenommen hatte, wurde die Ca^{2+} -Konzentration im Meßansatz auf 1.8 mM eingestellt und es kam zum Einstrom von Ca^{2+} in die Zellen. Im TRPM4b-exprimierenden Klon #9 ist dieser Ca^{2+} -Einstrom gegenüber den

Wildtyp HEK-293-Zellen signifikant erhöht.

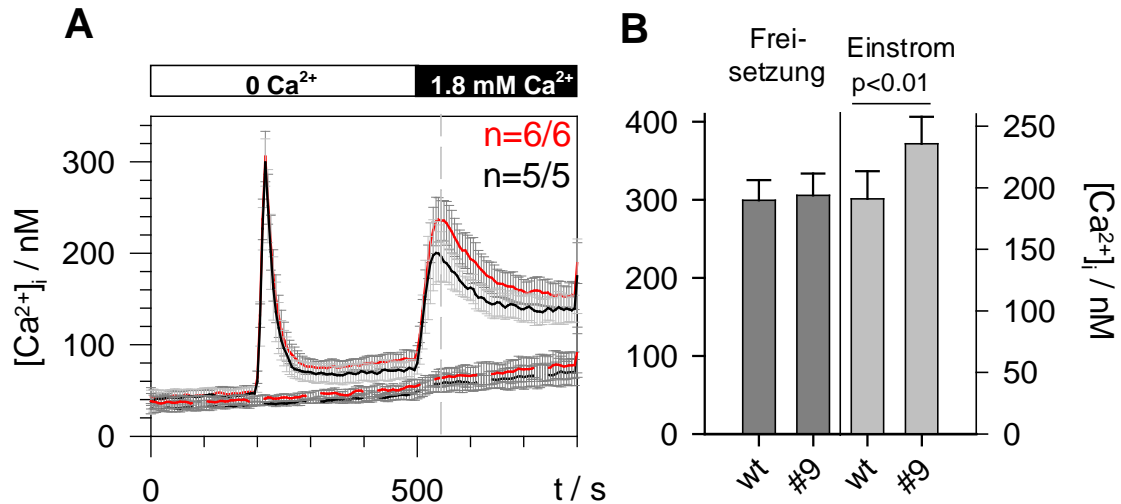


Abbildung 4.12: Expression von TRPM4b in HEK-293-Zellen verstärkt den durch Ionomycin verursachten Ca^{2+} -Einstrom, nicht jedoch die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern. Durch Ca^{2+} -Freisetzung und Ca^{2+} -Einstrom bedingte Veränderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde in Fura-2/AM-beladenen Wildtyp HEK-293-Zellen (schwarz) oder in Zellen des TRPM4b-exprimierenden HEK-293 Klon #9 (rot) mit dem 'Ca²⁺-free/Ca²⁺-readdition'-Protokoll verfolgt. Die zeitlichen Verläufe (A) sowie die max. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Ionomycin bzw. die max. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Ca²⁺-Readdition (B) sind als Mittel mit Standardabweichung (n=5 bis 6) angegeben. Mit gestrichelten Linien sind die Vehikel-Kontrollen dargestellt (n=5 bis 6). Die Ca²⁺-Freisetzung war in TRPM4b-exprimierenden Zellen gegenüber den Wildtyp-Zellen nicht verändert, der Ca²⁺-Einstrom ist hingegen signifikant erhöht.

4.3.4 Überexpression von TRPM4b vermindert die pharmakologisch induzierte Depolarisation der Plasmamembran

Der durch Ionomycin hervorgerufene Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran ist mit einer Depolarisation der Membran verbunden. Wenn die Depolarisation der Plasmamembran nicht durch den Ausstrom eines anderen Kations oder den Einstrom eines Anions (Cl^-) kompensiert wird, kommt der Ca^{2+} -Einstrom zum Erliegen (Fasolato und Pozzan, 1989). Darüber hinaus wird der Transport von Ca^{2+} aus der Zelle erleichtert, da der Konzentrationsgradient abnimmt und das Membranpotential dem Transport nicht mehr so stark entgegen wirkt. Für A23187 und Ionomycin existieren vereinzelte Berichte, dass diese die Plasmamembran auch unabhängig von extrazellulärem Ca^{2+} depolarisieren, die Ursache dafür ist unklar (Gukovskaya und Zinchenko, 1985).

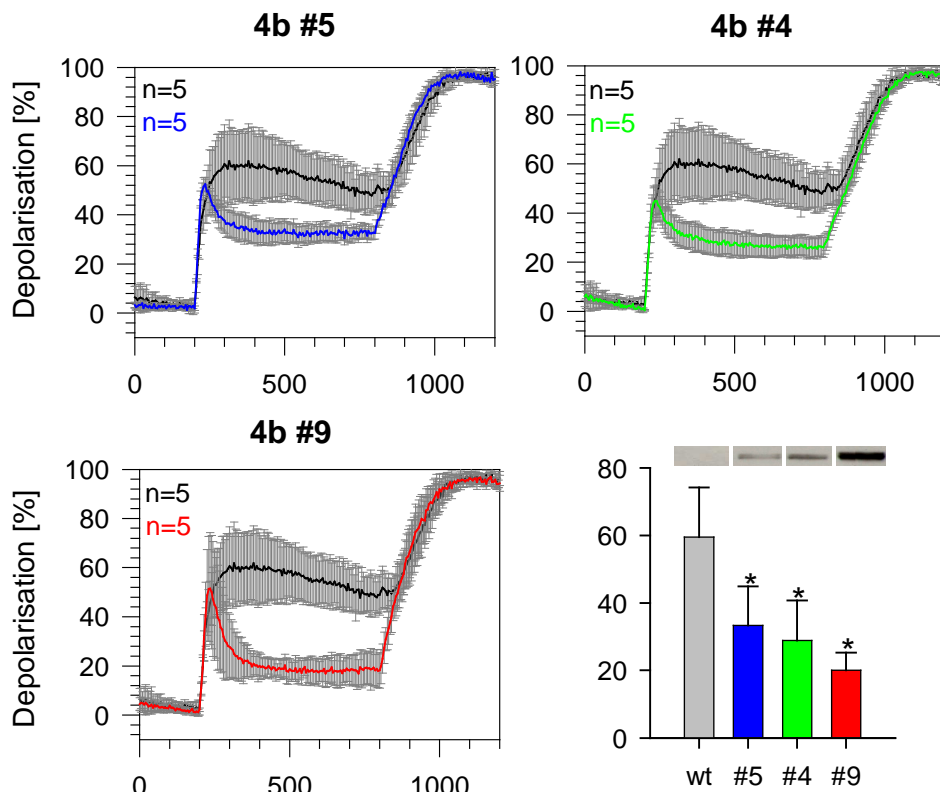


Abbildung 4.13: Verminderung der durch $1\ \mu\text{M}$ Ionomycin induzierten Depolarisation der Plasmamembran in TRPM4b überexprimierenden HEK-293-Zellen. Veränderungen des Membranpotentials in Wildtyp HEK-293-Zellen (schwarz) und pTRPMb-transfizierten Klonen (farbig) wurden mit dem Membranpotential-Indikator DiBAC4(3) verfolgt. Die Messwerte wurden auf Ruhemembran-Potential und max. Depolarisation mit $1\ \mu\text{M}$ Gramicidin normiert und als Anteil der maximalen Depolarisation dargestellt. Die Zugabe von Ionomycin erfolgte 200 s, die Zugabe von Gramicidin 800 s nach Start der Messung. Zum Vergleich der Stärke der Depolarisation mit der Höhe der Expression wurden in der Zusammenfassung unten rechts die Banden aus dem Westernblot über dem Balken für den jeweiligen Klon dargestellt.

Der Einfluß der Expression von TRPM4b auf Veränderungen des Membranpotential wurde fluorimetrisch mit dem Fluoreszenz-Farbstoff DiBAC4(3) verfolgt. Die Depolarisation nach Applikation von Ionomycin in Wildtyp HEK-293-Zellen ist schnell, ausgeprägt und lang anhaltend. 400 s nach Applikation von Ionomycin beträgt die Depolarisation der Membran $59.5\% \pm 14.7\%$ ($n=5$, SD) der maximalen Depolarisation durch Gramicidin (s. Abb. 4.13). In TRPM4b-exprimierenden HEK-293-Klonen ist die Depolarisation nach Ionomycin hinsichtlich Ausprägung und Kinetik verändert (s. Abb. 4.13). Die Depolarisation nach Ionomycin ist biphasisch: Nach einer initialen schnellen Depolarisation, die fast die Höhe in den Wildtyp-Zellen erreicht und etwas schneller ist als in diesen, sinkt das Membranpotential auf ein niedrigeres Niveau, das dann über den Zeitraum der Messung erhalten bleibt. Die Höhe dieses Niveaus ist

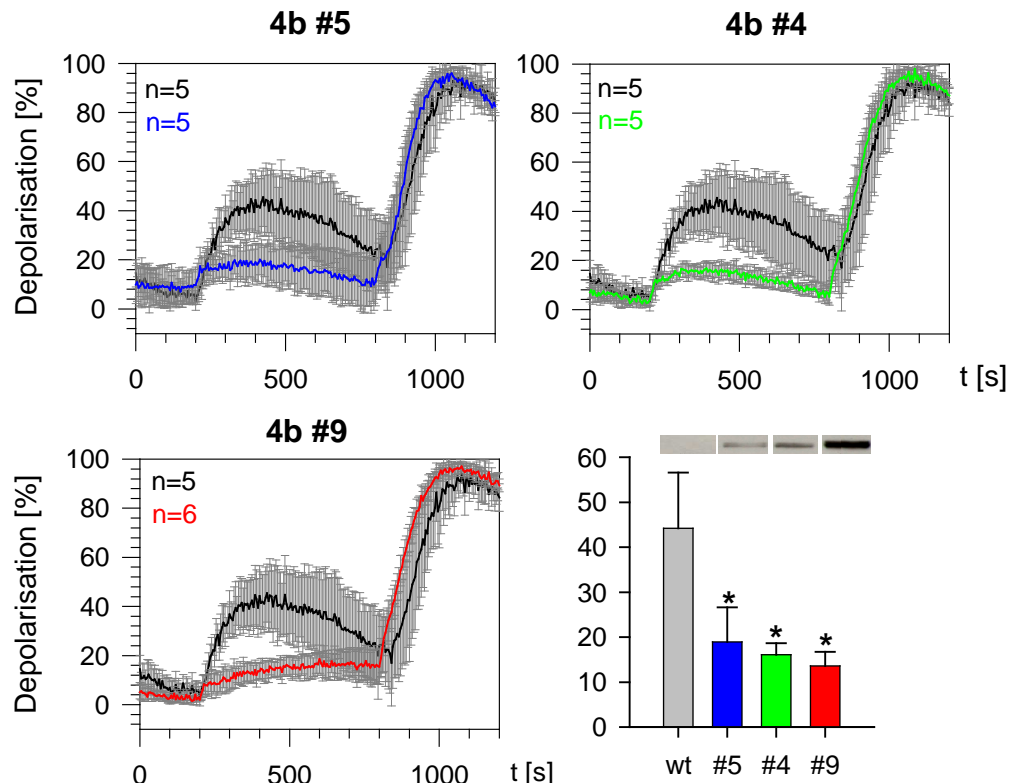


Abbildung 4.14: Verminderung der durch 100 μ M Carbachol induzierten Depolarisation der Plasmamembran in TRPM4b überexprimierenden HEK-293-Zellen. Veränderungen des Membranpotentials in Wildtyp HEK-293-Zellen (schwarz) und pTRPMb-transfizierten Klonen (farbig) wurden mit dem Membranpotential-Indikator DiBAC4(3) verfolgt. Die Messwerte wurden auf Ruhemembran-Potential und max. Depolarisation mit 1 μ M Gramicidin normiert und als Anteil der maximalen Depolarisation dargestellt. Die Zugabe von Carbachol erfolgte 200 s, die Zugabe von Gramicidin 800 s nach Start der Messung. Zum Vergleich der Stärke der Depolarisation mit der Höhe der Expression wurden in der Zusammenfassung unten rechts die Banden aus dem Westernblot über dem Balken für den jeweiligen Klon dargestellt.

dabei abhängig von der Höhe der TRPM4b-Expression, mit zunehmender Expression nimmt die Depolarisation ab, von $33.3\% \pm 11.5\%$ ($n=5$, SD) in Klon #5 bis $20.0\% \pm 5.2\%$ ($n=5$, SD) in Klon #9.

4.3.5 Überexpression von TRPM4b vermindert die physiologisch induzierte Depolarisation der Plasmamembran

Auch die Stimulation mit physiologischen Agonisten, wie Carbachol (CCh), einem Agonisten des in HEK-293-Zellen endogen exprimierten muscarinischen Acetylcholin-Rezeptors M3 (Anzellin et al., 1999), sowie ATP, einem Agonisten der in HEK-293-Zellen endogen exprimierten P2Y-Rezeptoren (Fischer et al., 2005) führt über die Bildung von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ zur Depletion

von intrazellulären Ca^{2+} -Speichern und damit zur Aktivierung eines Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran. Wie der durch Ionomycin aktivierte Ca^{2+} -Einstrom hat auch dieser eine Depolarisation der Plasmamembran zur Folge. Wie in Abb 4.14 zu erkennen, war die Depolarisation nach Stimulation mit Carbachol geringer und wies einen anderen zeitlichen Verlauf auf ($44.2\% \pm 12.4\%$ ($n=5$, SD) der maximalen Depolarisation durch Gramacidin). Während Ionomycin die Zellen innerhalb von Sekunden auf einen Wert depolarisierte, der dann, im Fall der Wildtyp-Zellen, über die Versuchsdauer konstant blieb, war die Depolarisation nach Stimulation mit Carbachol langsamer und transient. Die maximale Depolarisation wurde etwa 200 s nach Zugabe des Stimulus erreicht. In den TRPM4b-exprimierenden Zellen ist die Depolarisation weniger stark ausgeprägt. Die Höhe der maximal erreichten Depolarisation war dabei abhängig von der Höhe der TRPM4b-Expression, mit zunehmender Expression nahm die maximale Depolarisation ab, von $19.0\% \pm 7.7\%$ ($n=5$, SD) in Klon #5 bis $13.6 \pm 3.1\%$ ($n=6$, SD) in Klon #9.

Zusammenfassend ergibt sich folgendes Bild für die Rolle von TRPM4b: Pharmakologische Aktivierung von Ca^{2+} -Einstrom mit dem Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin oder Stimulation von Ca^{2+} -Einstrom durch Agonisten endogener Rezeptoren führte in HEK-293-Zellen zu einer Depolarisation. Die Expression von TRPM4b reduzierte die mit dem Ca^{2+} -Einstrom einhergehenden Depolarisation. Aufgrund des größeren elektrochemischen Antriebs für Ca^{2+} verstärkte das negativere Membranpotential in den TRPM4b-exprimierenden Zellen den Einstrom von Ca^{2+} . Bei TRPM4b handelt es sich also um einen positiven Regulator des Ca^{2+} -Einstroms.

4.3.6 Überexpression von TRPM4a vergrößert den durch Rezeptorstimulation freigesetzten Anteil der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher

Wie die Expression von TRPM4a als EGFP-Fusionsprotein gezeigt hat, ist dieser in intrazellulären Membranen lokalisiert, vermutlich im wesentlichen in der Membran des ER. Eine Analyse der Expression ist mit der Patch-clamp-Methode nicht möglich, da diese lediglich Ströme über die Plasmamembran erfasst. Bereits bei der Analyse des Einflusses von TRPM4b auf die Ca^{2+} -Freisetzung durch den P2Y-Agonisten ATP zeichnete sich ab, daß es einen Effekt von TRPM4b auf die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern gibt (s. Abb 4.15). Wie Abb. 4.5 zeigt, war bei Überexpression des Fusionsproteins auch eine Färbung von intrazellulären Strukturen zu erkennen. Damit war nicht auszuschließen, daß TRPM4b in ähnlicher Weise, wie es den Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran beeinflusst auch auf die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern wirkt. Sollte es sich bei dem im wesentlichen in der ER-Membran lokalisierten TRPM4a tatsächlich um einen funktionalen Ionenkanal mit ähnlichen Eigenschaften handeln, so könnte dieser ebenfalls die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern erleichtern.

Der Einfluß der Expression von TRPM4a auf die durch den P2Y-Agonisten ATP hervorge-

rufene Ca^{2+} -Freisetzung wurde fluorimetrisch mit dem ratiometrischen Ca^{2+} -Indikator Fura-2 untersucht. Dabei wurde das 'Ca²⁺-free/Ca²⁺-readdition'-Protokoll verwendet, mit dem die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern zeitlich vom Ca^{2+} -Einstrom separiert und somit getrennt untersucht werden kann.

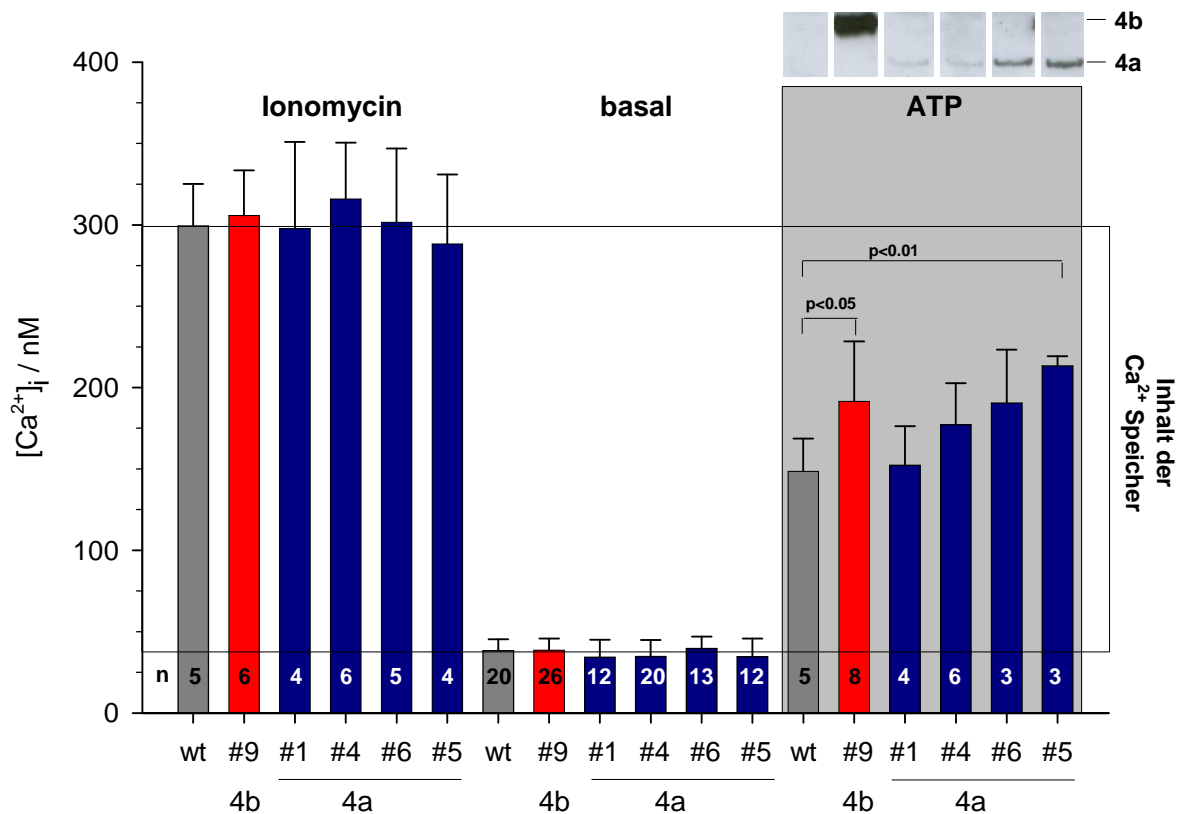


Abbildung 4.15: Vermehrte Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazelluläre Speichern durch ATP in TRPM4a-exprimierenden HEK-293-Zellen. Durch Ca^{2+} -Freisetzung bedingte Veränderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde in Fura-2/AM-beladenen Wildtyp HEK-293-Zellen (dunkelgrau), in Zellen des TRPM4b-exprimierenden HEK-293 Klon #9 (rot) sowie in verschiedenen TRPM4a-exprimierenden HEK-293-Klonen (blau) mit dem 'Ca²⁺-free/Ca²⁺-readdition'-Protokoll bestimmt. Die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ vor Stimulation und die max. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Ionomycin bzw. 100 μM ATP sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Die max. durch Ca^{2+} -Freisetzung erreichbare Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration ist als Speicher-Inhalt eingezeichnet. In TRPM4b und TRPM4a-exprimierenden HEK-293-Zellen ist der Anteil dieser Speicher, der durch ATP mobilisiert wird, signifikant höher als in Wildtyp Zellen. Bezogen auf die Höhe der Proteinexpression (Banden aus Westernblot über dem jeweiligen Klon) hat TRPM4a einen größeren Einfluß auf die Ca^{2+} -Freisetzung als TRPM4b.

Die Ca^{2+} -Konzentration vor Stimulation und die Ca^{2+} -Konzentration nach vollständiger Ca^{2+} -Freisetzung mit 1 μM Ionomycin unterschied sich zwischen Wildtyp HEK-293-Zellen und den Zellen der verschiedenen TRPM4-exprimierenden Klone nicht signifikant. Die Dif-

ferenz zwischen der Ca^{2+} -Konzentration nach vollständiger Freisetzung mit Ionomycin und Ruhe- Ca^{2+} -Konzentration ist dabei ein Maß für die Menge des insgesamt in den Speichern befindlichen Calciums.

Die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern durch Ionomycin führt nicht zu einer Aufladung der Membran der Speicher, da der Ca^{2+} -Transport durch Ionomycin elektro-neutral ist. Es handelt sich um eine Art erleichterte Diffusion, bei der die Carboxylatgruppen des Ionomycin in der Richtung des Konzentrationsgradienten Ca^{2+} und in die Gegenrichtung Protonen transportieren (Erdahl et al., 1994). Aus diesem Grunde kann Ionomycin den gesamten Speicherinhalt freisetzen, während dies bei physiologischer Stimulation, bei der Ca^{2+} durch die Pore des IP3-Rezeptors diffundiert, nicht der Fall ist.

Der Anteil dieser Speicher, der durch Stimulation mit $100 \mu\text{M}$ ATP freigesetzt werden konnte, war sowohl in TRPM4b-Klon #9 als auch in den TRPM4a-exprimierenden Klonen höher als in den Wildtyp-Zellen (die Unterschiede zwischen Wildtyp und 4b#9, sowie 4a#5 und den Wildtyp-Zellen waren dabei statistisch signifikant (t-Test nach Student)). Die Zunahme in der Ca^{2+} -Freisetzung hing dabei von der Höhe der Expression ab. Der Vergleich mit den Western-Blots zeigte, daß in den TRPM4a-exprimierenden Zellen der Anteil des aus den Speichern freigesetzten Ca^{2+} um so größer war, je höher die TRPM4a-Expression war. Bezogen auf die Höhe der Expression war der Effekt für TRPM4a deutlich ausgeprägter als für TRPM4b.

Die Ca^{2+} -Freisetzung in intakten Zellen ist experimentell nur schwer zu beeinflussen. Zur Untersuchung des Einflusses von TRPM4a auf die Ca^{2+} -Freisetzung wurden deshalb Experimente durchgeführt, bei denen mit Ins-1,4,5- P_3 Ca^{2+} aus Zellen freigesetzt wurde, die zuvor mit Saponin permeabilisiert wurden. Dazu wurden durch Zugabe von ATP zunächst die zellulären Ca^{2+} -Speicher mit Ca^{2+} beladen. Die Veränderung der Ca^{2+} -Konzentration in der Lösung wurde mit der freien Säure des Ca^{2+} -Indikators Fura-2 verfolgt. Anschließend wurde durch schrittweise Zugabe von Ins-1,4,5- P_3 eine Dosis-Wirkungskurve für die Ca^{2+} -Freisetzung durch Ins-1,4,5- P_3 aufgenommen.

Der Ersatz von K^+ im IZ-Puffer durch das für viele K^+ -Kanäle impermeable Cs^+ führte dazu, daß die Ca^{2+} -Freisetzung erst bei höheren Ca^{2+} -Konzentrationen erfolgte. Es konnte jedoch insgesamt der gleiche Anteil des zellulären Ca^{2+} -Pools freigesetzt werden (s. Abb. 4.16 A). Zwischen TRPM4a-exprimierenden Zellen und Wildtyp-Zellen gab es unter normalen Bedingungen keine signifikanten Unterschiede in der Ca^{2+} -Freisetzung (s. Abb. 4.16 B). Um auszuschließen, daß mehrere Mechanismen beteiligt sind, die sich gegenseitig überlagern, wurden weitere Experimente durchgeführt, bei denen entweder eine Vielzahl von K^+ -Kanälen durch den Ersatz des K^+ im Puffer durch Cs^+ (s. Abb. 4.16 C), oder Apamin-sensitiver Ca^{2+} -aktivierter K^+ -Kanäle, für die eine Beteiligung an der Ca^{2+} -Freisetzung diskutiert wird (Nguyen et al., 1998) durch das Bienengift Apamin gehemmt wurden (s. Abb. 4.16 D).

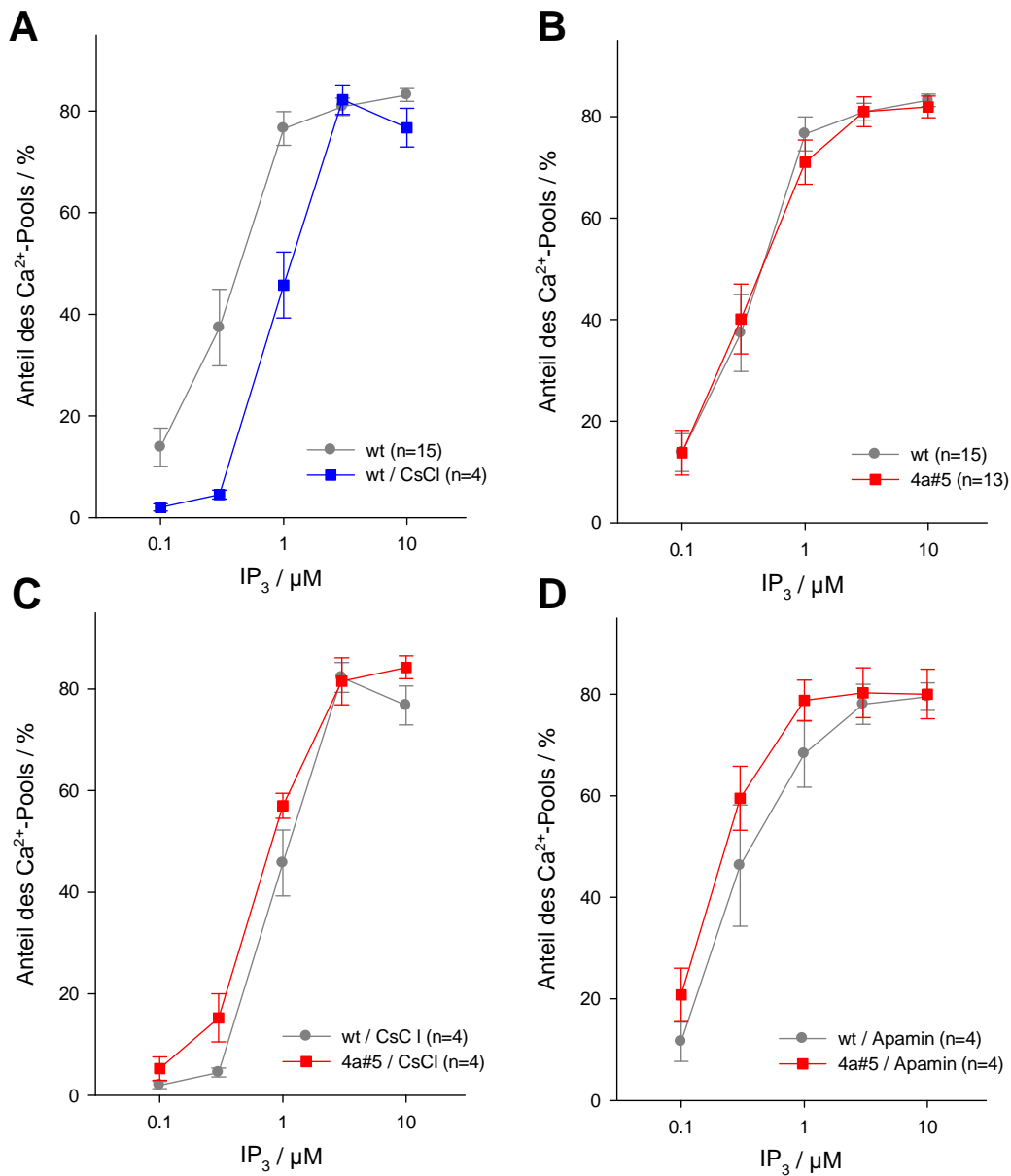


Abbildung 4.16: Bei Inhibition von K^+ -Kanälen erleichterte TRPM4a die Ca^{2+} -Freisetzung aus permeabilisierten HEK-293-Zellen durch Ins-1,4,5- P_3 . Der Einfluß von TRPM4a auf die Ca^{2+} -Freisetzung durch Ins-1,4,5- P_3 wurde an Saponin-permeabilisierten HEK-293-Zellen untersucht. Die Dosis-Wirkungsbeziehung wurde durch sukzessive Erhöhung der Ins-1,4,5- P_3 -Konzentration ermittelt. Die Menge des durch Ins-1,4,5- P_3 freigesetzten Ca^{2+} wurde als Anteil des gesamten mit Ionomycin mobilisierbaren Pools dargestellt. (A) Ersatz von K^+ durch das für viele K^+ -Kanäle impermeable Cs^+ führte in Wildtyp-Zellen zu einer Verschiebung der Dosis-Wirkungskurve nach rechts, erschwerte also die Ca^{2+} -Freisetzung. Dies bestätigt die Bedeutung des Einstroms monovalenter Ionen für die Ca^{2+} -Freisetzung. (B) TRPM4a hatte unter normalen Bedingungen keinen Einfluß auf die Ca^{2+} -Freisetzung. Wurden K^+ -Kanäle durch Ersatz von K^+ durch Cs^+ (C), oder spezifisch Apamin-sensitive K^+ -Kanäle durch $1 \mu M$ Apamin (D) gehemmt, so führte die Expression von TRPM4a dazu, daß Ca^{2+} bereits bei geringeren Ins-1,4,5- P_3 -Konzentrationen freigesetzt wurde als in den Wildtyp-Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler.

In beiden Fällen war die Dosis-Wirkungskurve für die TRPM4a-exprimierenden Zellen gegenüber der für die Wildtypen leicht, wenn auch nicht signifikant, zu niedrigeren Ins-1,4,5-P₃-Konzentrationen verschoben. Diese Ergebnisse sprechen für die Beteiligung mehrerer Systeme. Bei Hemmung eines dieser Systeme kann der Ausfall durch die anderen partiell kompensiert werden.

Zusammenfassend ergab sich folgendes Bild für die Wirkung von TRPM4a auf die Ca²⁺-Freisetzung: In intakten TRPM4a-exprimierenden Zellen setzte der P2Y-Agonist ATP einen signifikant größeren Anteil der zellulären Ca²⁺-Speicher frei. Experimente an permeabilisierten Zellen bestätigten die Rolle des K⁺-Einstroms für die Ca²⁺-Freisetzung. Inhibition der Ca²⁺-Freisetzung durch den Block von K⁺-Kanälen wurde durch Expression von TRPM4a partiell kompensiert. TRPM4a ist also in der Lage, in ähnlicher Weise, wie TRPM4b den Ca²⁺-Einstrom moduliert, die Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speichern zu beeinflussen.

4.4 Aktivierung von endogenem TRPM2 in JMP T-Lymphozyten durch ADPR

Die endogene Expression von TRPM2 in JMP-Zellen wurde mit Hilfe der Patch-clamp-Methode untersucht. Es wurden Ganzzelleableitungen im Spannungsklemmen-Modus durchgeführt. Abb. 4.17 zeigt, daß die Infusion von 300 µM ADPR über die Pipette in JMP-Zellen zur langsamen Aktivierung eines Stromes mit linearer IV-Beziehung und einem Umkehrpotential von etwas über 0 mV führte. Da bislang kein anderer, durch ADPR aktivierter Kanal der Plasmamembran beschrieben worden ist und sekundäre Effekte durch eine Erhöhung der cytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration in einem Patch-clamp-Experiment mit Ca²⁺-gepufferter Pipettenlösung nicht zum Tragen kommen, handelt es sich bei dem beobachteten Strom aller Wahrscheinlichkeit nach um einen TRPM2-Strom.

4.4.1 Wirkung des NAD-Glykohydrolase-Inhibitors 3GA sowie von 8-Br-ADPR auf die Aktivierung von TRPM2 durch ADPR

Um die Bedeutung von TRPM2 und des ADPR/TRPM2-Signalwegs in zellulären Vorgängen, wie Proliferation und Apoptose, oder in physiologischen Prozessen wie der Immunantwort untersuchen zu können, ist es von entscheidender Bedeutung pharmakologische Substanzen in der Hand zu haben, die mit hoher Spezifität mit diesen Signalwegen interferieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Substanzen auf ihre Wirkung auf die Aktivierung von endogenem TRPM2 durch ADPR untersucht. 3GA (auch Cibacron blue) ist als Inhibitor von NAD-Glykohydrolasen beschrieben worden (Yost und Anderson, 1981; Kim et al., 1993; Li et al., 2002).

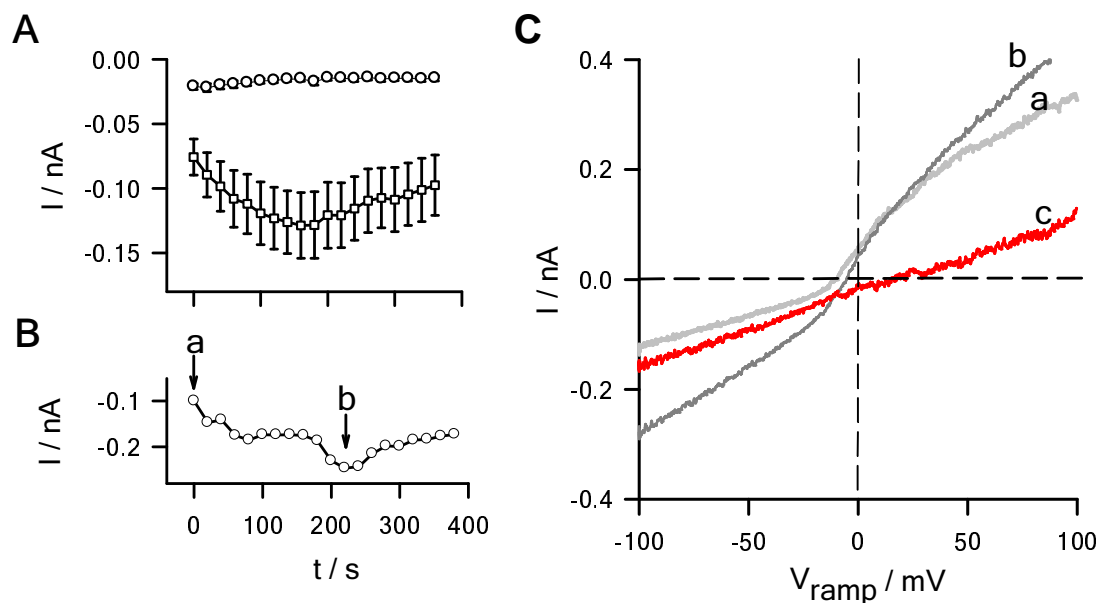


Abbildung 4.17: Aktivierung nicht-selektiver Kationenströme durch 300 μM ADPR in Wildtyp JMP-Zellen. Die Expression und Aktivierung von TRPM2 in Wildtyp JMP-Zellen wurde in Patch-clamp-Experimenten untersucht. Die Experimente wurden als Ganzzelleableitung im Spannungsklemmen-Modus durchgeführt. (A) Kinetik der Aktivierung von TRPM2 (Strom bei -80 mV) nach Infusion von $300\ \mu\text{M}$ ADPR bei $100\ \text{nM}$ freiem Ca^{2+} (quadratische Symbole, $n=21$). Als Kontrolle wurden Zellen mit Intrazellulär Puffer (runde Symbole, $n=12$) infundiert. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler. (B) Zeitliche Entwicklung des Stroms nach Infusion von $300\ \mu\text{M}$ ADPR in einer einzelnen Zelle. Alle 20 s wurden Spannungsrampen von -100 mV bis $+100\text{ mV}$ aufgenommen. (C) Zur Ermittlung des IV-Kennlinie wurden Spannungsrampen nach Herstellen der Ganzzell-Konfiguration (a) und nach Aktivierung des Stroms (b) voneinander subtrahiert (c, rot)

Mit 3GA läßt sich in die rezeptorvermittelte Bildung von ADPR eingreifen, um die mögliche Rolle von ADPR als sekundärer Botenstoff zu untersuchen. Um dabei mögliche direkte Effekte von 3GA auf TRPM2 auszuschließen, wurde die zellulär wirksame Konzentration im Patch-clamp-Experiment auf ihren Einfluß auf die Aktivierung von TRPM2 durch ADPR untersucht. Dabei zeigte sich, daß der durch $300\ \mu\text{M}$ ADPR aktivierte Strom ($-129 \pm 25\ \text{pA}$, $n=25$, Mittel \pm SEM) durch die Gegenwart von $100\ \mu\text{M}$ 3GA nicht signifikant vermindert wird ($-143 \pm 53\ \text{pA}$, $n=9$, Mittel \pm SEM). In Konzentrationen in denen 3GA die Bildung von ADPR effektiv inhibiert hat es also keinen Einfluß auf die direkte Aktivierung von TRPM2 durch ADPR.

Die von Tim Walseth und Mitarbeitern (University of Minnesota, Mineapolis, USA) synthetisierte Verbindung 8-Br-ADPR ist strukturell zu ADPR verwandt. Für viele 8-Derivate von cADPR ist eine antagonistische Wirkung auf die cADPR-vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung beschrieben (Walseth und Lee, 1993; Fliegert, 1999; Guse, 2004). Die Möglichkeit, daß die

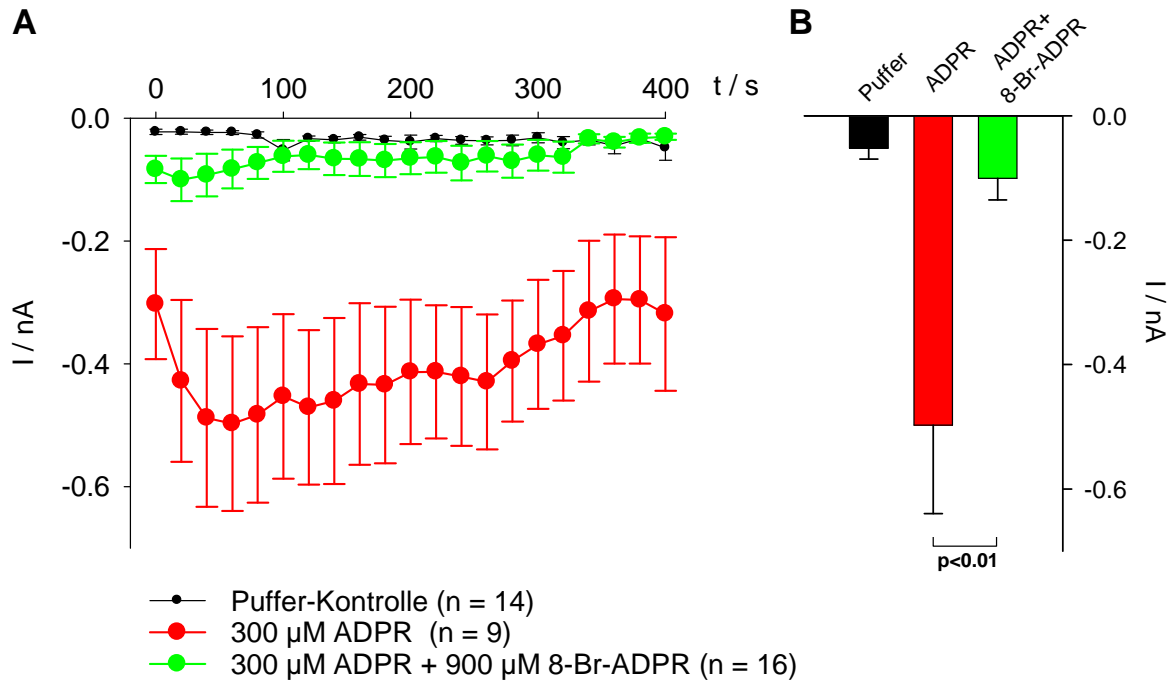


Abbildung 4.18: Inhibition ADPR-aktivierter Kationenströme in Wildtyp JMP-Zellen durch 8-Br-ADPR. Die Wirkung von 8-Br-ADPR auf die Aktivierung von endogenem TRPM2 durch ADPR wurde in JMP-Zellen in Patch-clamp-Experimenten als Ganzzelleableitung im Spannungsclamm-Modus untersucht. (A) Kinetik der Aktivierung von TRPM2 (Strom bei -80 mV) nach Infusion von 300 μM ADPR (rot) oder 300 μM ADPR + 900 μM 8-Br-ADPR (grün). Als Kontrolle wurden Zellen mit Intrazellulärpuffer infundiert (schwarz, alle mit 100 nM freiem Ca²⁺). Alle 20 s wurden Spannungsrampen von -100 mV bis +100 mV aufgenommen. (B) Vergleich der Amplituden nach max. Stromentwicklung. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler.

entsprechenden linearen Verbindungen auf TRPM2 wirken liegt also recht nahe. Eine mögliche antagonistische Wirkung von 8-Br-ADPR auf die ADPR-vermittelte TRPM2-Aktivierung wurde im Patch-clamp-Experiment untersucht. Wie Abb. 4.18 zeigt, unterdrückte ein dreifacher Überschuss von 8-Br-ADPR - 900 μM gegenüber 300 μM ADPR - die Aktivierung von TRPM2 nahezu vollständig. Bei 8-Br-ADPR handelt es sich also um den ersten bekannten kompetitiven ADPR-Antagonisten.

5 Diskussion

5.1 Expression von TRPM4-Splicevarianten

Für das humane TRPM4-Gen sind mehrere Splicevarianten beschrieben worden. Mittlerweile ist unumstritten, daß es sich bei dem Produkt des Vollängentranskripts TRPM4b um einen Ionenkanal handelt (Launay et al., 2002; Nilius et al., 2003; Launay et al., 2004). Über Expression und Funktion der Splicevarianten ist bislang wenig bekannt. Splice-Varianten sind für eine Vielzahl von TRP-Kanälen beschrieben worden (Übersicht in Lis et al., 2005). Sie können die Funktion von multimeren TRP-Kanälen modulieren, oder mit ihrer Funktion interferieren und stellen einen Mechanismus dar, wie die Zelle TRP-Kanäle an verschiedene Funktionen oder zelluläre Umgebungen anpassen kann. Die Identifizierung funktioneller Domänen von TRP-Kanälen durch Analyse von Splice-Varianten kann zum Verständnis der Struktur-Funktionsbeziehung beitragen (Lis et al., 2005). Um die Bedeutung verschiedener Splice-Varianten richtig einschätzen zu können, ist es entscheidend zu wissen, ob die Transkripte überhaupt translatiert werden können und die Proteinprodukte tatsächlich in der Zelle vorliegen.

Xu et al. (2001) haben bei der Erstbeschreibung von TRPM4a eine N-terminal verkürzte cDNA kloniert (Genbank, gi:15617228) und sind davon ausgegangen, daß es sich bei dem ersten AUG mit offenem Leseraster um das Start-Codon handelt. Nach der Klonierung von TRPM4b haben Launay et al. (2002) vorgeschlagen, daß die Transkription von TRPM4a und TRPM4b an alternativen Promotoren initiiert wird. Mittlerweile konnte ein längeres TRPM4a-Transkript isoliert werden (Genbank, gi:31335330), das zeigt, daß die Initiation der Transkripte von TRPM4a und TRPM4b an der gleichen Stelle erfolgt und im Falle von TRPM4a lediglich die Codons 3 und 4 durch alternatives Splicing deletiert werden. Daraus folgt aber, daß das Start-AUG des TRPM4b-Transkripts in Exon 1 auch im TRPM4a-Transkript vorhanden ist (s. Abb. 4.1).

In dieser Arbeit wurde bei der Erzeugung der Vektoren für die rekombinante Expression der Kontext der Start-Codons nicht modifiziert. Die Tatsache, das in den stabilen Klonen detektierbare Mengen sowohl von TRPM4a als auch von TRPM4b exprimiert wurden zeigt, daß beide Start-Codons in der Lage sind, die Translation zu initiieren. Allerdings wiesen alle untersuchten TRPM4a-Klone eine im Vergleich zu den TRPM4b-Klonen niedrigere Expression auf. Dies ist vermutlich auf die nicht der Kozak-Sequenz (CCACCAUGG) entsprechende Umgebung des Start-Codons für TRPM4a zurückzuführen. Die Transkriptions-Initiationsfrequenz

ist auf Grund dessen geringer als für TRPM4b. Eine interessante Frage ist, ob in diesem Fall die Initiation der Transkription am ersten oder am zweiten AUG erfolgt. Während die Initiation am zweiten AUG zu dem Proteinprodukt TRPM4a führt, würde bei Initiation am ersten AUG lediglich ein kurzes Protein gebildet werden. Die Reanalyse einer Vielzahl von Genen durch [Peri und Pandey \(2001\)](#) hat gezeigt, daß 40% aller Transkripte ein AUG vor dem eigentlichen Initiatorcodon enthalten und daß viele authentische Initiatorcodons von der Konsensussequenz abweichen. In einigen der analysierten Gene weicht der Kontext des eigentlichen Initiatorcodons sogar stärker von der Konsensussequenz ab, als das 5'-gelegene AUG. Es sind auch Fälle beschrieben worden in denen bei derartiger Anordnung beide Proteinprodukte gebildet werden. Es wird vermutet, daß das erste Leseraster im wesentlichen die Initiationsfrequenz des zweiten herabsetzt und somit eine regulatorische Funktion hat ([Bergenheim et al., 1992](#); [Kozak, 1987](#)).

Für TRPM4c existiert bislang lediglich ein Datenbank-Eintrag (Genbank, gi:31335334), der die Expression einer entsprechenden mRNA in Lungenkrebszellen dokumentiert. Eine funktionelle Charakterisierung durch heterologe Expression oder eine Beschreibung des endogenen Proteins ist bislang nicht publiziert worden. In der vorliegenden Arbeit war die Anzahl der transfizierten Klone, in denen mittels RT-PCR das rekombinante Transkript für TRPM4c nachgewiesen werden konnte (vier von neun untersuchten Klonen) vergleichbar mit den pTRPM4a bzw. pTRPM4b transfizierten Zellen (fünf bzw. sechs von jeweils neun untersuchten Klonen). Während jedoch bei den mit pTRPM4a und pTRPM4b transfizierten Klonen auch die Bildung des Proteins nachgewiesen werden konnte, gelang dies bei den pTRPM4c-transfizierten Klonen nicht. Auch in den transient mit pEGFP-N1-TRPM4c transfizierten Zellen konnte im Gegensatz zu den pEGFP-N1-TRPM4a und pEGFP-N1-TRPM4b transfizierten Zellen das Protein durch Western-Blotting nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), obwohl eine EGFP-Fluoreszenz zu sehen war, die zeigt, daß das Protein exprimiert worden sein muß. Da TRPM4c zwei der sechs Transmembranhelices fehlen, besteht die Möglichkeit, daß es nach Synthese am ER proteolytisch degradiert wird. Im Falle des Fusionsproteins kann das stabile EGFP noch persistieren.

Obwohl die Analyse der Expression von endogenem TRPM4 in HEK-293-Zellen mittels RT-PCR zeigte, daß diese Zellen mehrere alternativ gespligte Transkripte des TRPM4-Gens coexprimieren, konnten im Western-Blot keine Proteinprodukte nachgewiesen werden. Möglicherweise ist die Expression der Proteine jedoch so gering, daß ein Nachweis mit dem verwendeten Verfahren nicht möglich war. Die Ergebnisse stehen damit im Widerspruch zu denen von [Launay et al. \(2004\)](#), die im Westernblot die Expression von TRPM4b in HEK-293-Zellen nachweisen konnten. Wie von [Nilius et al. \(2003\)](#) beschrieben und im Unterschied zu den von [Launay et al. \(2002\)](#) publizierten Ergebnissen konnte in der vorliegenden Arbeit im Patch-clamp-Experiment kein Strom mit der für TRPM4b beschriebenen Charakteristik nachgewiesen werden. Damit eignen sich HEK-293-Zellen trotz der endogenen Expression von

TRPM4-Transkripten als Zellsystem für die Überexpression. Für die Lokalisation innerhalb der Zelle und die Analyse ihrer Funktion wurden die klonierten TRPM4-Splice-Varianten deshalb in HEK-293-Zellen überexprimiert.

5.2 Subzelluläre Lokalisation von TRPM4-Splicevarianten

Die EGFP-Fusionsproteine der Splicevarianten TRPM4a und TRPM4b zeigen markante Unterschiede hinsichtlich ihrer subzellulären Lokalisation. Während TRPM4b im wesentlichen in Plasmamembran und intrazellulären Transportvesikeln lokalisiert ist, findet sich TRPM4a ausschließlich in Kernhülle und endoplasmatischem Retikulum.

Die publizierten Daten zur Lokalisation von TRPM4a sind widersprüchlich. Die immunhistochemische Analyse von HEK-293-Zellen, die markiertes TRPM4a transient überexprimieren, zeigt eine Lokalisation 'in der Nähe der Plasmamembran' (Xu et al., 2001). Die Tatsache, daß eine N-terminal verkürzte TRPM4b-Variante (Δ N-TRPM4b) nach Expression in HEK-293-Zellen durch Oberflächenjodierung markiert werden konnte (Launay et al., 2004), deutet ebenfalls auf eine Lokalisation in der Plasmamembran. Funktionale Daten sprechen hingegen gegen die Lokalisation in der Plasmamembran. Hofmann et al. (2003) haben die Aktivierung von TRPM4b, TRPM4a und TRPM5 durch Infusion von Ca^{2+} oder durch Stimulation mit Histamin im Patch-clamp-Experiment in der 'whole cell'-Konfiguration untersucht. Dabei konnten in den TRPM4a-exprimierenden Zellen im Gegensatz zu TRPM4b- und TRPM5-exprimierenden HEK-293-Zellen keine konsistenten Ströme gemessen werden.

Der Transport von Proteinen innerhalb der Zelle ('protein trafficking') wird, beginnend im endoplasmatischen Retikulum, durch die molekulare Erkennung von Signalsequenzen gesteuert. Dabei handelt es sich um kurze Bereiche (wenige Aminosäuren) die sich an verschiedenen Stellen der Primärstruktur befinden können. Am Transport von Proteinen innerhalb des ER und aus dem ER sind verschiedene Signale beteiligt: (i) Retentionssignale, die den Transport aus dem ER verhindern, (ii) Rückholssignale ('retrieval signals'), die für den Rücktransport entkommener Proteine ins ER sorgen, und (iii) Exportsignale, die den Export aus dem ER lenken (Alberts et al., 2002; Ellgaard und Helenius, 2003). Für viele luminal Proteine und Typ I Transmembranproteine sind Retentions- und Rückholssignale beschrieben worden. Hauptsächlich handelt es sich um C-terminale KDEL, RRXX- oder KKXX-Motive (Ellgaard und Helenius, 2003). Bislang konnten nur für wenige Typ III Transmembranproteine Retentionssignale identifiziert werden. Diese bestehen aus basischen Sequenzmotiven (RXR, KR, RRKK und RR) im cytosolischen Bereich von Ionenkanälen (O'Kelly et al., 2002; Scott et al., 2001; Zerangue et al., 1999).

Die Menge eines Ionenkanals, die an die Zelloberfläche gelangt, wird im ER durch das Gleichgewicht von Export- und Retentionsmechanismen bestimmt. Die Effektivität des Proteinexports wird dabei nicht nur durch richtige Faltung des Proteins und die korrekte As-

semblierung zu Oligo-/Multimeren, sondern auch durch vorhandene Exportsignale bestimmt (Ma et al., 2001, 2002). Bei K_{ATP} -Kanälen finden sich ER-Retentionssignale sowohl in der porenbildenden α - als auch in der β -Untereinheit. Erst durch die korrekte Assoziation von α - und β -Untereinheit zu Oktameren wird das Retentionssignal maskiert und der Kanal dann in die Membran transportiert (Zerangue et al., 1999). Der metabotrope Glutamatrezeptor mGluR1 weist in seinem C-Terminus ein ER-Retentionssignal (RRKK) auf. Während die Isoform mGluR1b im ER retardiert wird, wird mGluR1a, bei dem das ER-Retentionssignal durch eine Isoform-spezifische Sequenz maskiert wird, in die Membran transportiert (Chan et al., 2001).

Transmembranhelix 6

```

1021 VLLLVIFLLV ANILLVLLLI AMFSYTFGKV QGNSDLYWKA QRYRLIREFH SRPALAPPFI 1080
1081 VISHLRLLLLR QLCRRRPSQ PSSPALEHFR VYLSKEAERK LLTWESVHKE NFLLRARDK 1140
1141 RESDSERLKR TSQKVDLALK QLGHIREFEQ RLKVLEREVQ QCSRVLGWVA EALSRALLP 1200
1201 PGGPPPPDLP GSKD 1214

```

Abbildung 5.1: Multiple, putative ER-Retentionssignale im C-Terminus von TRPM4. Für Typ III-Transmembranproteine sind basische ER-Retentionssignale beschrieben worden, die sich an unterschiedlichen Stellen im cytosolischen Bereich des Proteins befinden können. Dargestellt ist der cytosolische C-Terminus von TRPM4 beginnend mit dem Ende der Transmembranhelix 6. In rot sind basische Sequenzmotive gekennzeichnet, die publizierten ER-Retentionssignalen entsprechen.

TRPM4a und TRPM4b weisen in ihren cytosolischen Termini mehrere basische Sequenzmotive auf, die als ER-Retentionssignale in Frage kommen (s. Abb. 5.1). Der Export aus dem ER und damit der Transport in die Membran erfordert somit, daß diese Retentionssignale maskiert oder inaktiviert werden. Wie das Beispiel der K_{ATP} -Kanäle zeigt, kann dies durch Assoziation zu Multimeren erfolgen (Zerangue et al., 1999). Seit der Entdeckung der TRP-Kanäle wird in Analogie zu spannungsabhängigen Na^+ - und Ca^{2+} -Kanälen eine Tetramerisierung angenommen (s. Abb. 5.2, Clapham et al. (2001)). Diese spannungsabhängigen Kanäle weisen in ihrer Sequenz vier Gruppen mit je sechs Transmembranhelices auf, wobei die Schleifen zwischen fünfter und sechster TM-Helix dieser vier Gruppen die Pore des Kanals bilden. Bei TRP-Kanälen assoziieren vier Monomere zu einem Tetramer (Kedei et al., 2001). Jedes Monomer weist sechs Transmembranhelices auf. Die Schleifen zwischen fünfter und sechster TM-Helix der Monomere bilden nach Tetramerisierung zusammen die Pore. Aufgrund der ähnlichen Anordnung ist zu vermuten, daß wie für TRPV1 gezeigt (Garcia-Sanz et al., 2004), N- und C-Termini der Monomere an deren Assoziation zum Tetramer beteiligt sind .

Die Tetramerisierung ist also ein möglicher Weg, wie die Retentionssignale im Falle von TRPM4b maskiert werden könnten. Da TRPM4a ein Teil des N-Terminus fehlt, ist TRPM4a möglicherweise nicht in der Lage, das Retentionssignal zu maskieren und wird im ER retardiert. Die intrazelluläre Lokalisation von TRPM4a kann mehrere Bedeutungen haben: (i) TRPM4a Homotetramere fungieren als Ionenkanäle in der Membran des ER, (ii) TRPM4a bildet Heterotetramere mit TRPM4b und verhindert auf diese Weise, das TRPM4b in die Plasmamembran gelangt, (iii) TRPM4a ist Teil eines Heterotetrameren-Kanals, der Transport in die Plasmamembran erfordert die Interaktion mit einem TRPM, der in den untersuchten Zellsystemen nicht exprimiert wird. Für eine Rolle von TRPM4a als negativer Regulator von TRPM4b (ii) sprechen Ergebnisse von [Launay et al. \(2004\)](#), die zeigten, daß eine N-terminal verkürzte Form von TRPM4b (Δ N-TRPM4b) dominant negativ auf TRPM4b wirkt. Die Analyse der Ca^{2+} -Freisetzung in TRPM4a-exprimierenden Zellen läßt aber auch auf eine eigene Funktion von TRPM4a in der Modulation der zellulären Ca^{2+} -Signaltransduktion schließen.

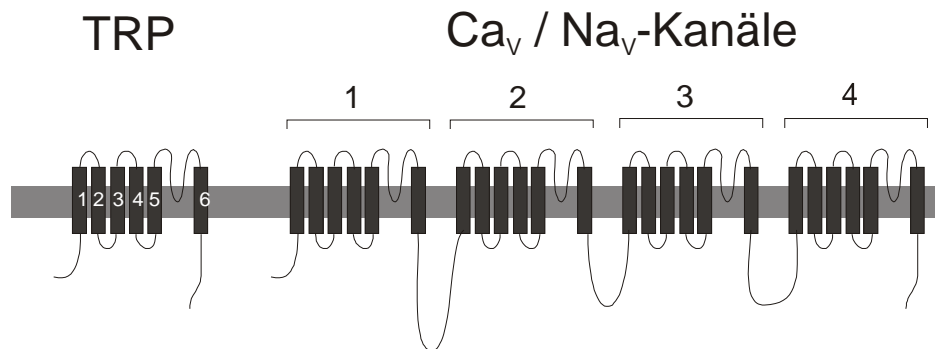


Abbildung 5.2: Vergleich der Struktur von TRP-Kanälen und spannungsabhängigen Na^+ - und Ca^{2+} -Kanälen. Spannungsabhängige Na^+ - und Ca^{2+} -Kanäle bestehen aus einer Polypeptidkette mit vier Gruppen von jeweils sechs Transmembranhelices. Sie weisen also insgesamt 24 Transmembranhelices auf. Die Proteine der TRP-Familie hingegen besitzen nur sechs Transmembranhelices. Für TRPV1 konnte gezeigt werden, daß ein funktionaler TRP-Kanal durch Assoziation von vier Monomeren entsteht ([Kedei et al., 2001](#)). Dabei können sowohl Homotetramere als auch Heterotetramere eng miteinander verwandter Familien entstehen ([Hellwig et al., 2005](#)).

5.3 TRPM4b und die Regulation des Ca^{2+} -Einstroms

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei TRPM4b-exprimierende HEK-293-Klone mit unterschiedlicher hoher Expression erzeugt. Die Expression im höchstexprimierenden Klon wurde im Patch-clamp-Experiment überprüft. Die TRPM4b-exprimierenden Zellen zeigen im Gegensatz zu den Wildtyp-Zellen die bereits von [Nilius et al. \(2003\)](#) beschriebenen Ca^{2+} -aktivierbaren Ströme mit einem Umkehrpotential bei etwa 0 mV und auswärtsgerichteter Charakteristik.

Der Einfluß von TRPM4b auf das zelluläre Ca^{2+} -Signal wurde untersucht, in dem die Veränderung der zellulären Ca^{2+} -Konzentration mit dem Ca^{2+} -Indikator Fura-2 verfolgt wurde. Als Stimulus wurde Ionomycin gewählt. Das Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin induziert Speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstrom, in dem es in die Membran intrazellulärer Speicher inseriert und die Speicher damit depletiert (Morgan und Jacob, 1994). TRPM4b-exprimierende HEK-293-Zellen zeigen nach Stimulation mit Ionomycin einen signifikant höheren Ca^{2+} -Einstrom als die Wildtyp-Zellen. Dies zeigt, daß TRPM4b, trotz der im Patch-clamp-Experiment geringen Sensitivität gegenüber Ca^{2+} (Nilius et al., 2003), in intakten Zelle aktiviert werden kann. Mögliche Erklärungen sind, daß: (i) cytoplasmatisches ATP und Calmodulin, die während des Patch-clamp-Experiments stark verdünnt werden, TRPM4b in der intakten Zelle für Ca^{2+} sensitivieren (Nilius et al., 2005a) und daß (ii) subzellulär in der Zelle sehr viel höhere Ca^{2+} -Konzentrationen auftreten, als Messungen an Zellsuspensionen vermuten lassen. So konnte in Neutrophilen mit Hilfe eines membranständigen Ca^{2+} -Indikators gezeigt werden, daß die Ca^{2+} -Konzentration an der Plasmamembran in der Umgebung von Ca^{2+} -Kanälen nach Stimulation mit fMLP auf über $30 \mu\text{M}$ ansteigt (Davies und Hallett, 1998). In Glattmuskelzellen steigt die Ca^{2+} -Konzentration in sogenannten Sparks auf 'hohe mikromolare Konzentrationen', die für die Aktivierung Ca^{2+} -aktivierten Cl^- - und K^+ -Kanälen erforderlich sind (Wellman und Nelson, 2003).

Trotzdem sind die Ergebnisse zunächst erstaunlich, da Launay et al. (2002) beschrieben haben, daß es sich bei TRPM4b um einen negativen Regulator des Ca^{2+} -Einstroms handelt: Stimulation von nicht-erregbaren Zellen führt zur Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern und verbunden damit zur Aktivierung eines elektrogenen Ca^{2+} -Einstroms über die Plasmamembran. Der Ca^{2+} -Einstrom depolarisiert die Membran. Aktivierung von TRPM4b durch die Erhöhung der cytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration führt dann zum Einstrom von Na^+ und damit zur weiteren Depolarisation, die den elektrochemischen Antrieb für Ca^{2+} herabsetzt. Es strömt weniger Ca^{2+} in die Zelle (s. Abb. 5.3 links).

Daher wurden die mit der Stimulation durch Ionomycin einhergehenden Veränderungen des Membranpotentials mit dem Potential-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff DiBAC4(3) untersucht. Wie die Wildtyp-Zellen depolarisieren auch die TRPM4b-transfizierten HEK-293-Zellen nach Applikation von Ionomycin, die Depolarisation erreicht ihr Maximum sogar etwas schneller. Die TRPM4b-exprimierenden Zellen repolarisieren jedoch anschließend auf ein Plateau, daß signifikant niedriger ist, als in den Wildtyp-Zellen. Das negativere Membranpotential erklärt den stärkeren Ca^{2+} -Einstrom, da der elektrochemische Antrieb für Ca^{2+} größer ist.

Nach Stimulation mit CCh, einem Agonisten des cholinergen M3-Rezeptors, kommt es in Wildtyp HEK-293-Zellen ebenfalls zu einer Depolarisation der Membran. Diese erfolgt langsamer, ist weniger stark ausgeprägt als die nach Ionomycin und transient. Die CCh-induzierte Depolarisation ist in den TRPM4b-exprimierenden Zellen weniger stark ausgeprägt als in den Wildtyp-Zellen, eine initial schnellere Depolarisation wie bei Applikation von Ionomycin

wurde hingegen nicht beobachtet.

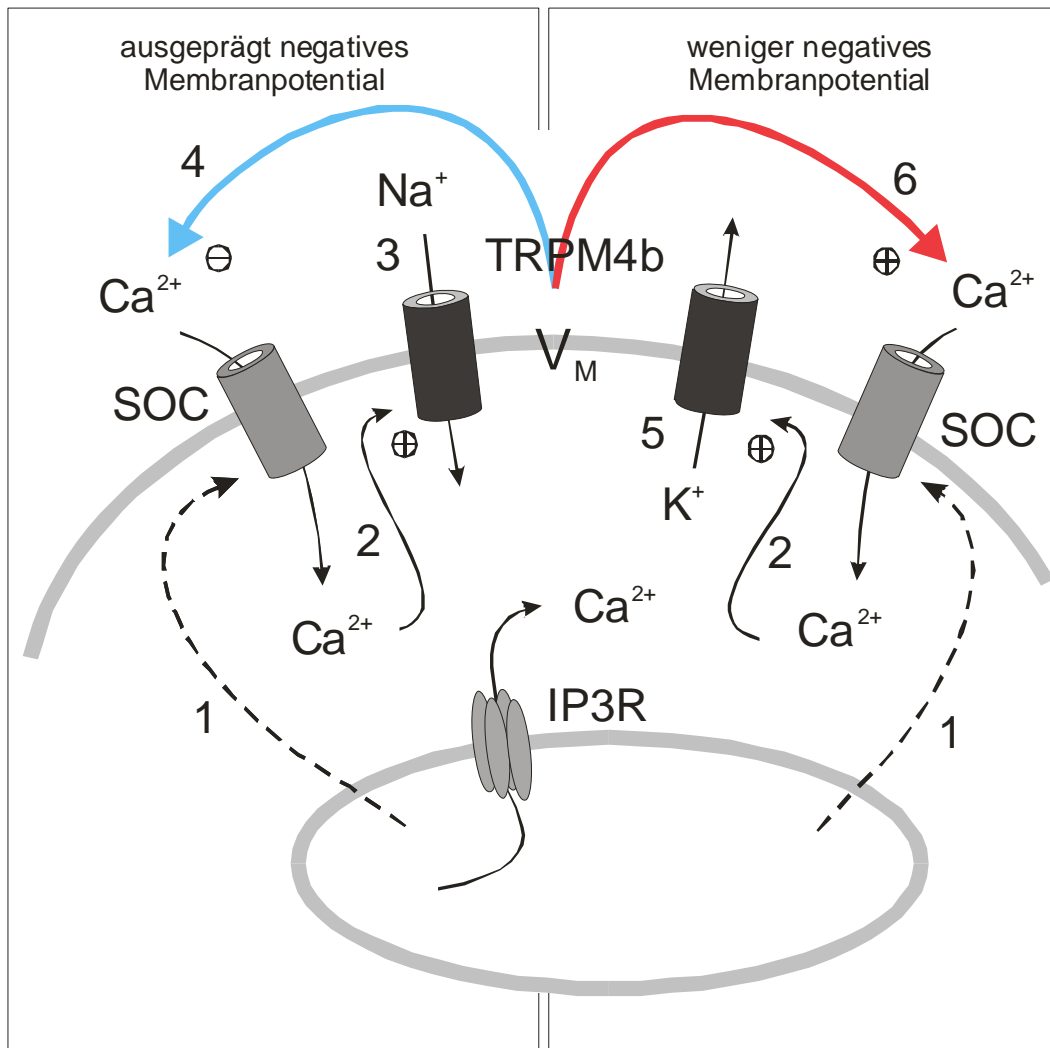


Abbildung 5.3: Einfluß von TRPM4b auf den Ca²⁺-Einstrom in nicht-erregbaren Zellen mit unterschiedlichem Ruhemembranpotential Die Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern führt zur Aktivierung von Speicher-abhängigen Ca²⁺-Kanälen in der Plasmamembran (1), durch den Anstieg der cytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration wird TRPM4b aktiviert (2). In Zellen mit negativem Membranpotential führt der Einstrom von Na⁺ durch TRPM4b (3) zu einer Depolarisation der Membran und damit zur Hemmung des Ca²⁺-Einstroms (4). In Zellen mit positiverem Membranpotential verhindert TRPM4b die Depolarisation über 0 mV hinaus, ggf. strömt K⁺ aus der Zelle (5), somit wird eine Reduktion des Ca²⁺-Einstroms durch zunehmende Depolarisation verhindert (6).

Die unterschiedlichen Beobachtungen hinsichtlich des Einflusses von TRPM4b auf das Ca²⁺-Signal lassen sich wie folgt erklären: [Launay et al. \(2002\)](#) haben durch ATP-stimulierte Ca²⁺-Signale in TRPM4b-exprimierende HEK-293-Zellen im 'whole-cell' Patch-clamp-Ex-

periment untersucht. Dabei war das Membranpotential auf -60 mV geklemmt, 'um den Ca^{2+} -Einstrom zu verstärken'. Die Stimulation mit 1 mM ATP erfolgte einige Minuten nach Durchbrechen in den 'whole cell'-Modus. ATP induzierte transiente Ca^{2+} -Signale, die jeweils mit einem einwärtsgerichteten Strom verbunden waren. Bei einem Membranpotential von -60 mV läßt TRPM4b im wesentlichen Na^+ in die Zelle und trägt damit zur Depolarisation bei.

HEK-293-Zellen haben jedoch normalerweise ein viel geringeres Membranpotential (je nach Meßmethode zwischen -15 und -30 mV, Yamada et al. (2001)). Da TRPM4b nicht zwischen Na^+ oder K^+ differenziert, hat die Expression von TRPM4b in Zellen mit geringem Membranpotential zwei verschiedene Effekte. Strömt nach Depletion intrazellulärer Speicher Ca^{2+} über die Plasmamembran ein, kommt es zu einer Aktivierung von TRPM4b. Die Öffnung von TRPM4b führt zunächst zu einer beschleunigten Depolarisation der Membran. Da durch TRPM4b bei einem Membranpotential über 0 V mehr K^+ aus der Zelle als Na^+ in die Zelle strömt, verhindert TRPM4b die Depolarisation über 0 V hinaus und wirkt damit der Reduktion des Ca^{2+} -Einstroms entgegen (s. Abb. 5.3 rechts). Bei Zellen mit geringem Membranpotential, wie z.B. Zellen des Gefäßendothels (Nilius et al., 1997), bei denen in Folge Rezeptor-vermittelter Ca^{2+} -Einstroms die Membran über 0 V hinaus depolarisieren würde, kann TRPM4b somit als positiver Regulator des Ca^{2+} -Einstroms wirken.

5.4 TRPM4a und die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier TRPM4a-exprimierende HEK-293-Klone mit unterschiedlicher hoher Expression erzeugt. Die Überexpression von TRPM4a in HEK-293-Zellen führte dazu, daß der durch Stimulation mit dem P2Y-Agonisten ATP freigesetzte Anteil intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher zunahm. Da TRPM4a sich in seinem N-terminalen Bereich, nicht jedoch im Bereich der Pore von TRPM4b unterscheidet, ist anzunehmen, daß TRPM4a viele der Eigenschaften, wie Ionenselektivität und Spannungsabhängigkeit mit TRPM4b teilt. Wenn TRPM4a als funktionaler tetramerer Kanal in der Membran des ER vorliegt, so könnte er in ähnlicher Weise auf die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER wirken, wie TRPM4b den Ca^{2+} -Einstrom beeinflusst.

Ca^{2+} -Speicherung im ER und die Dynamik der Ca^{2+} -Freisetzung sind bislang wenig verstandene Phänomene. Die schnelle Freisetzung von Ca^{2+} durch IP₃- und Ryanodin-Rezeptor erfordert einen hohen Konzentrationsgradienten zwischen dem Lumen des ER und dem Cytosol. An der Erzeugung bzw. Erhaltung dieses Konzentrationsgradienten sind Ca^{2+} -ATPasen und Ca^{2+} -bindende Proteine beteiligt. Im Cytosol wird die freie Ca^{2+} -Konzentration durch Bindung an Proteine mit hoher Affinität und die Aktivität von Ca^{2+} -ATPasen in ER (SERCA) und Plasmamembran (PMCA) niedrig gehalten. Durch die vergleichsweise niedrige Affinität der Ca^{2+} -bindenden Glykoproteine des ER (Calsequestrin und Calreticulin) ist die

freie Ca^{2+} -Konzentration im Lumen des ER höher als im Cytosol. Ein permanenter Ca^{2+} -Leckstrom aus dem ER ins Cytoplasma wird durch die Ca^{2+} -ATPase des ER kompensiert.

Neben dem Konzentrationsgradienten spielen auch monovalente Kationen eine wichtige Rolle bei der Ca^{2+} -Freisetzung. In einer isosmotischen Sucroslösung ohne monovalente Kationen setzte Ins-1,4,5- P_3 kein Ca^{2+} aus ER-Mikrosomen (Muallem et al., 1985) oder dem ER permeabilisierter Leberzellen (Joseph und Williamson, 1986) frei. Die Ca^{2+} -Freisetzung lies sich durch verschiedene monovalente Kationen rekonstituieren. Dabei waren K^+ , Na^+ , Rb^+ und Cs^+ etwa gleich effektiv (Shah et al., 1987). Unspezifische K^+ -Kanal-Blocker wie TEA und Nonyltriethylammonium blockierten die Ins-1,4,5- P_3 -vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung aus Rattenhirnmikrosomen. Mit $^{86}\text{Rb}^+$ wurde gezeigt, daß Ins-1,4,5- P_3 zusammen mit der Freisetzung von Ca^{2+} auch die Aufnahme von monovalenten Kationen in die Speicher stimuliert (Shah und Pant, 1988). Lee et al. (1993) zeigten in verschiedenen Tumorzelllinien, daß K^+ -Kanal-Inhibitoren wie TEA und 4-Aminopyridin die CCh- oder Serum-stimulierte Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern inhibierte. Die Ins-1,4,5- P_3 -vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung aus Membranpräparationen von Thrombozyten konnten O'Rourke et al. (1994) mit den spezifischeren K^+ -Kanalblockern Apamin und TPA hemmen; die Inhibition konnte mit dem K^+ -Ionophor Valinomycin oder dem K^+/H^+ -Ionophor Nigericin aufgehoben werden.

Zusammengenommen stützen die Ergebnisse ein von Muallem et al. (1985) formuliertes Model, nach dem die elektrogene Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER durch den Einstrom von Gegenionen kompensiert wird. Der Einstrom von Gegenionen verhindert die Veränderung des ER-Membranpotentials, die dem fortgesetzten Ca^{2+} -Ausstrom entgegenwirken würde.

Marhl et al. (1997) haben ein mathematisches Modell für Oszillationen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration formuliert. In diesem Modell ist das ER-Membranpotentials wesentlich an der Entstehung von Ca^{2+} -Oszillationen beteiligt. Aufgrund ihres Modells sagten Marhl et al. (1998) ein ER-Potential voraus, daß zwischen -6 mV und +3 mV oszilliert. Eine experimentelle Bestimmung des ER-Membranpotentials ist bislang nicht publiziert worden. Auch sind die Ionenverhältnisse im ER unklar.

Der Einstrom von monovalenten Kationen ins ER ist nicht nur für den Erhalt der Elektroneutralität entscheidend. Die Verdrängung von Ca^{2+} aus der Bindung an Ca^{2+} -bindende Proteine des ER spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle. Nach Nguyen et al. (1998) fungieren die Ca^{2+} -bindenden Glykoproteine des ER als polyanionische $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ -Austauscher, die die Ca^{2+} -Konzentration im ER in Ruhe in einem intermediären Bereich von 20 – 35 μM halten. Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER führt dann zur Aktivierung von Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanälen in der ER-Membran. Der Anstieg der luminalen K^+ -Konzentration setzt Ca^{2+} aus seiner Bindung an Calsequestrin und Calreticulin frei. Die freie luminalen Ca^{2+} -Konzentration steigt auf 100 – 300 μM an und der elektrochemischer Antrieb für Ca^{2+} nimmt entsprechend zu. Der Effekt von K^+ auf die Ca^{2+} -Affinität Ca^{2+} -bindender Protein konnte *in vitro* demonstriert werden Mitchell et al. (1988). Auf diese Weise könnte die Zelle den auftretenden

Ca^{2+} -Leckstrom aus dem ER und damit den Energiebedarf für die SERCA senken und die Präzipitation von Ca^{2+} -Phosphaten im ER verhindern, gleichzeitig erklärt das Modell die Notwendigkeit des Einstroms monovalenter Kationen.

Obwohl also das eigentliche Phänomen, daß für die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER der Einstrom monovalenter Kationen erforderlich ist, seit 20 Jahren bekannt und unumstritten ist, konnte es bislang nicht eindeutig einem Ionenkanal zugeordnet werden; zu unterschiedlich sind die experimentellen Daten zur Pharmakologie und Ionenselektivität. Dies deutet darauf hin, daß (i) mehrere Mechanismen beteiligt oder (ii) in verschiedenen Spezies bzw. Zelltypen unterschiedliche Kanäle beteiligt sind.

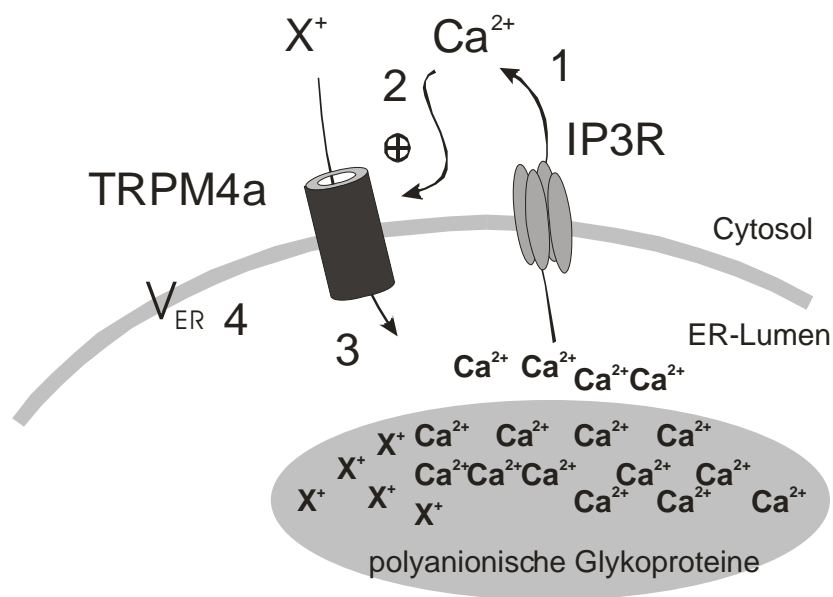


Abbildung 5.4: Modell der vermehrten Ca^{2+} -Freisetzung in TRPM4a-exprimierenden Zellen. Zwischen dem Lumen des ER und dem Cytosol besteht ein Ca^{2+} -Konzentrationsgradient. Bei Öffnung von IP3R oder Ryanodin-Rezeptor strömt Ca^{2+} ins Cytosol (1) und aktiviert Ca^{2+} -aktivierte Ionenkanäle u.a. TRPM4a in der Umgebung (2). Durch den Einstrom von monovalenten Ionen wird Ca^{2+} aus seiner Bindung an die luminalen Ca^{2+} -bindenden Proteine des ER verdrängt (3). Die freie luminalen Ca^{2+} -Konzentration nimmt zu und der elektrochemische Antrieb für Ca^{2+} steigt. Der Einstrom von monovalenten Ionen verhindert zudem, daß sich aufgrund des elektrogenen Ca^{2+} -Ausstroms das ER-Membranpotential in einer Weise verändert, die den fortgesetzten Ca^{2+} -Ausstrom verhindert (4).

Um zu überprüfen, ob TRPM4a an der Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern beteiligt ist, wurde die Ca^{2+} -Freisetzung in der vorliegenden Arbeit durch Ins-1,4,5- P_3 in einem zellfreien System permeabilisierter HEK-293-Zellen untersucht. Die Dosis-Wirkungskurve für die Ca^{2+} -Freisetzung durch Ins-1,4,5- P_3 zeigte keine Unterschiede zwischen TRPM4a-exprimierenden und Wildtyp-Zellen. Ersatz von K^+ im Puffer gegen das für viele K^+ -Kanäle

impermeable Cs^+ und Inhibition von Apamin-sensitiven Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanälen (ASK_{Ca}) mit dem Bienengift Apamin erschwerte die Ca^{2+} -Freisetzung durch Ins-1,4,5-P_3 (Verschiebung der Dosis-Wirkungskurve zu höheren Ins-1,4,5-P_3 -Konzentrationen), wobei die Effekte teilweise durch TRPM4a (der für Cs^+ -Ionen permabel ist) kompensiert wurden. Diese Ergebnisse liefern erste Hinweise auf die Beteiligung von TRPM4a an der Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern, jedoch wird die Beurteilung durch die schlechte Kontrollierbarkeit vieler Parameter in dem Messsystem erschwert. Die Beladung der Ca^{2+} -Speicher über die SERCA erfolgt durch Zugabe eines Systems aus ATP, Creatinphosphat und Creatinkinase. Die relativen Konzentrationen von ATP, ADP und AMP, die freie Mg^{2+} -Konzentration und die Verfügbarkeit von Calmodulin liegen damit außerhalb der Kontrolle des Experimentators. Diese Faktoren beeinflussen die Ca^{2+} -Sensitivität von TRPM4b (Nilius et al., 2005a) und sind somit auch mögliche Regulatoren von TRPM4a.

Eine Beteiligung mehrerer Systeme ist typisch für das sogenannte 'Ca²⁺-toolkit' (Berridge et al., 2000). Viele der an der Ca^{2+} -Signaltransduktion beteiligten Proteine existieren in verschiedenen Isoformen mit unterschiedlichen Eigenschaften. Ein Beispiel dafür sind die Isoformen des IP₃-Rezeptors mit ihrer unterschiedlichen Sensitivität gegenüber Ca^{2+} . Zum Teil werden auch unterschiedliche Systeme für die gleiche Aufgabe eingesetzt, so erfolgt der Transport von Ca^{2+} aus der Zelle sowohl durch $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) als auch über Plasmamembran Ca^{2+} -ATPasen (PMCA). Durch abgestimmte Expression ausgewählter Komponenten ist die Zelle damit in der Lage, die Signaltransduktion mittels Ca^{2+} ihren Erfordernissen anzupassen (Berridge et al., 2000).

5.5 Pharmakologische Modulation von TRPM2

ADPR kann als Folge vieler zellulärer Prozesse gebildet werden, so beim Abbau des sekundären Botenstoffs cADPR, im Pyrimidin-Stoffwechsel, durch cytosolische und ekto-Glykohydrolasen, beim Abbau von PARP und ADP-ribosylierten Proteinen und in Mitochondrien. Seit dem ersten Berichten, daß der Ionenkanal TRPM2 durch die cytoplasmatische ADPR-Konzentration reguliert wird (Perraud et al., 2001; Sano et al., 2001), wird auch über eine mögliche Rolle von ADPR als sekundärer Botenstoff spekuliert.

Damit ADPR als sekundärer Botenstoff betrachtet werden kann, muß folgender kausaler Zusammenhang bestehen: (i) Stimulation der Zelle führt zu einer Veränderung der zellulären ADPR-Konzentration, (ii) die resultierende Veränderung der zellulären ADPR-Konzentration aktiviert oder inaktiviert TRPM2, und (iii) die Veränderung der TRPM2-Aktivität ist maßgeblich an der Initiierung der durch die Stimulation ausgelösten physiologischen Effekte (wie Apoptose oder Proliferation) beteiligt. Darüber hinaus muß die Inhibition der ADPR-Konzentrationsänderung zu einer Entkoppelung von Stimulus und physiologischem Effekt führen (iv).

Von Gasser und Guse (2005) ist ein für die Bestimmung von zellulären ADPR-Konzentrationen geeignetes HPLC-System etabliert worden. Damit konnte gezeigt werden, daß die ADPR-Konzentration in Jurkat T-Lymphozyten nach Stimulation mit dem Lektin Concanavalin A auf das 1.5-fache der Ruhekonzentration ansteigt (persönliche Mitteilung A. Gasser).

Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Anstieg der ADPR-Konzentration und Aktivierung von TRPM2 kann der NAD-Glykohydrolase-Inhibitor Cibacron Blue (3GA) verwendet werden. Diese Substanz bindet auch an andere NAD-Bindungsstellen und wurde zur Affinitätsreinigung von NAD-abhängigen Oxidoreduktasen eingesetzt. Um auszuschließen, daß 3-GA die Aktivität von TRPM2 durch direkte Bindung beeinflußt, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob 3GA die direkte Aktivierung von TRPM2 durch ADPR inhibiert. Bei einer Konzentration von 100 μM - einer Konzentration, die bei extrazellulärer Applikation den ADPR-Anstieg in der Zelle vollständig inhibierte (persönliche Mitteilung A. Gasser) - zeigte 3GA keinen Einfluß auf die Aktivierung von TRPM2 durch ADPR. 3GA ist also ein geeignetes Pharmakon, um zu untersuchen, ob der Anstieg der ADPR-Konzentration für die Aktivierung von TRPM2 notwendig ist.

Für TRPM2 standen bislang nur Inhibitoren mit geringer Spezifität zur Verfügung. So konnte gezeigt werden, daß 50 μM –1 mM Flufenamic acid (FFA) die Aktivierung von TRPM2 inhibiert (Hill et al., 2004), FFA wirkt jedoch auch auf eine Vielzahl andere Ionenkanäle (Stumpff et al., 2001; Shimamura et al., 2002; Zwart et al., 1995). Kolisek et al. (2005) haben gezeigt, daß der cADPR-Antagonist 8-Br-cADPR die Aktivierung von TRPM2 durch supraphysiologische Konzentrationen cADPR oder durch Wasserstoffperoxid, nicht jedoch die Aktivierung durch ADPR inhibiert. 8-Br-cADPR inhibiert auch die cADPR-vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung durch den Ryanodin-Rezeptor (Walseth und Lee, 1993). Ca^{2+} sensitiviert TRPM2 für ADPR. Die duale Wirkung kompliziert die Anwendung von 8-Br-cADPR zur Analyse einer möglichen Coaktivierung von TRPM2 durch cADPR im zellulären Kontext.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde im Patch-clamp-Experiment die Wirkung der von Tim Walseth und Mitarbeitern (University of Minnesota, Minneapolis, USA) synthetisierten linearen Verbindung 8-Br-ADPR auf die ADPR-vermittelte Aktivierung von TRPM2 untersucht. Ein dreifacher Überschuß von 8-Br-ADPR unterdrückte die Aktivierung von TRPM2 durch ADPR nahezu vollständig. Mit diesem kompetitiven TRPM2-Antagonisten wird es in Zukunft möglich sein, die Beteiligung eines möglichen TRPM2-Signalweges an verschiedenen physiologischen Prozessen zu untersuchen.

Zusammen erlauben 3GA und 8-Br-ADPR eine mögliche ADPR/TRPM2-Signalkette an verschiedenen Stellen zu unterbrechen und zu untersuchen, ob dies zu einer Entkopplung von Stimulus und physiologischem Effekt führt. Zusammen mit molekulargenetischen Methoden werden sie wichtiger Bestandteil bei der Analyse des Signalwegs sein.

Die cytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration moduliert nahezu alle zellulären Prozesse, von der Genexpression, über Veränderungen des Cytoskletts bis zur Aktivität metabolischer Enzyme. Sie ist maßgeblich an Vorgängen wie Proliferation, Differenzierung, Zellmotilität und der Induktion der Apoptose beteiligt. Die den Veränderungen der Ca^{2+} -Konzentration zugrundeliegenden Prozesse werden untersucht, seit Sidney Ringer 1883 entdeckte, daß isolierte Rattenherzen Ca^{2+} in der Lösung benötigen um zu kontrahieren (Übersicht in [Carafoli, 2003](#)). Seit dem sind viele der beteiligten Mechanismen entdeckt und bis in ihre molekularen Details aufgeklärt worden. Andere, wie der oder die am kapazitativen Ca^{2+} -Einstrom beteiligten Kanäle, konnten trotz intensiver Bemühungen bislang nicht identifiziert werden.

Die Rolle, die die erst seit kurzem bekannten TRPM-Kanäle in der Modulation des zellulären Ca^{2+} -Signals spielen, beginnt sich hingegen gerade erst abzuzeichnen. Das Beispiel TRPM4 verdeutlicht, daß auch Ca^{2+} -impermeable Ionenkanäle über ihre Wirkung auf das Membranpotential das zelluläre Ca^{2+} -Signal entscheidend beeinflussen können. Besonders interessant wird dabei sein, zu sehen, welche Rolle TRPM4a und TRPM4b mit ihrer unterschiedlichen Lokalisation bei der Entstehung komplexer räumlicher und zeitlicher Strukturen subzellulärer Ca^{2+} -Signale und Ca^{2+} -Oszillationen spielen. Wie diese Muster entstehen und welche Rolle sie spielen ist noch weitgehend unverstanden ([Thomas et al., 1996](#)).

Der ADPR-aktivierte Ionenkanal TRPM2 stellt möglicherweise einen ganz neuen Weg dar, wie in nicht-erregbaren Zellen unabhängig von kapazitativen Mechanismen Ca^{2+} -Einstrom hervorgerufen werden kann. Vieles deutet auf eine Beteiligung an der Induktion der Apoptose ([Hara et al., 2002](#)) aber auch an anderen Prozessen, wie der Chemotaxis von Granulozyten ([Heiner et al., 2005](#)). Spezifischen Pharmaka wie 3GA und 8-Br-ADPR werden in Zukunft dabei helfen, zu untersuchen an welchen physiologischen Prozessen dieser Signalweg beteiligt ist.

Die potentielle Rolle der TRPM-Kanäle in vielen physiologischen Vorgängen und ihre mögliche Beteiligung an der Pathogenese von Erkrankungen wie Krebs (TRPM1 und TRPM8, [Duncan et al., 1998](#); [Tsavaler et al., 2001](#)) oder Störungen des $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Haushalts (TRPM6 und TRPM7, [Schlingmann et al., 2002](#); [Chubanov et al., 2004](#)) hat sie zu vielversprechenden Zielen für die Entwicklung neuer therapeutischer Pharmaka gemacht ([Xie et al., 2004](#); [Gudermann und Flockerzi, 2005](#)). Ein wichtige Voraussetzung für die Entwicklung solcher Therapeutika ist jedoch, neben dem Wissen über die Funktion der TRPM-Kanäle auf molekularer Ebene, das Verständnis dafür, wie sie in das komplexe Signaltransduktions-Netzwerk der Zelle integriert sind und welche Rolle sie damit für den ganzen Organismus spielen.

6 Zusammenfassung

TRPM2 und TRPM4 sind Mitglieder der Melastatin-Familie der TRP-Ionenkanäle. Für das humane TRPM4-Gen wurden mehrere alternative Transkripte beschrieben (Xu et al., 2001; Launay et al., 2002). Beim Produkt des Vollängentranskripts TRPM4b handelt es sich um einen Ca^{2+} -aktivierten, spannungsabhängigen Ionenkanal, der für monovalente Kationen, nicht jedoch für Ca^{2+} permeabel ist (Launay et al., 2002; Nilius et al., 2003). Die Produkte der anderen Splicevarianten sind hingegen bislang kaum charakterisiert worden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von TRPM4 in der humanen Zelllinie HEK-293 untersucht. Die Analyse mittels RT-PCR zeigte, daß HEK-293-Zellen Transkripte der Splicevarianten TRPM4a und TRPM4c coexprimieren. Ein Nachweis endogener Proteine im Westernblot gelang jedoch nicht, so daß HEK-293-Zellen trotz der positiven RT-PCR als Zellsystem für die Überexpressionsanalyse geeignet sind. Die cDNA für TRPM4a wurde mittels RT-PCR aus HEK-293-Zellen kloniert; ausgehend von der TRPM4a-cDNA wurden mittels PCR-basierter Methoden Expressionsvektoren für TRPM4b und TRPM4c konstruiert. Anschließend wurden alle drei Isoformen transient als EGFP-Fusionsproteine exprimiert und die Lokalisation in der Zelle durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Während TRPM4b in der Plasmamembran der Zelle lokalisiert war, fanden sich TRPM4a und TRPM4c überwiegend im ER. Zur funktionellen Analyse wurden durch Transfektion und Klonierung HEK-293-Zelllinien mit stabiler Überexpression von TRPM4b und TRPM4a generiert. In Zelllinien mit stabiler Überexpression des Transkripts für TRPM4c konnte kein entsprechendes Protein nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurden in den TRPM4b-exprimierenden Zellen Expression und Lokalisation in der Plasmamembran im Patch-clamp-Experiment durch Nachweis des für TRPM4b charakteristischen Stromes bestätigt.

Der Einfluß von TRPM4b auf das Membranpotential und das Ca^{2+} -Signal wurde mit Hilfe fluorimetrischer Methoden untersucht. In den HEK-293-Zellen verringerte die Expression von TRPM4b die mit dem Ca^{2+} -Einstrom nach Stimulation mit dem Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin oder dem ACh-Rezeptor-Agonisten Carbachol einhergehende Depolarisation der Plasmamembran. In der Folge kam es zu einem stärkeren Einstrom von Ca^{2+} als in den Wildtyp-Zellen. TRPM4b kann daher in Zellen mit weniger negativem Membranpotential (etwa -15 bis -30 mV in HEK-293-Zellen) als positiver Regulator des Ca^{2+} -Einstroms wirken.

In TRPM4a-exprimierenden Zellen setzt die Stimulation mit dem P2Y-Agonisten ATP einen größeren Anteil der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher frei als in den Wildtyp-Zellen. Der Einfluß von TRPM4a auf die Ca^{2+} -Freisetzung durch Ins-1,4,5-P_3 wurde in permeabilisier-

ten Zellen untersucht. Der Einfluß von TRPM4a wurde erst bei Ersatz von K^+ durch Cs^+ oder nach Inhibition von spezifischen Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanälen mit Apamin erkennbar. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß TRPM4a die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern erleichtert, in dem der Aufbau eines höheren ER-Membranpotentials verhindert wird. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, daß es sich bei den TRPM4-Splicevarianten TRPM4a und TRPM4b um Modulatoren des zellulären Ca^{2+} -Signals handelt. Die Wirkung auf das Ca^{2+} -Signal ist dabei abhängig von der intrazellulären Lokalisation des Kanals. Während TRPM4b in der Plasmamembran, abhängig vom Ruhemembranpotential der Zelle und der mit dem Ca^{2+} -Einstrom einhergehenden Depolarisation, den Ca^{2+} -Einstrom sowohl verstärken als auch reduzieren kann, erleichtert die Expression von TRPM4a in der Membran des ER die Freisetzung von Ca^{2+} .

TRPM2 ist ein Ca^{2+} - und Na^+ -permeabler Ionenkanal, der durch Adenosindiphosphoribose (ADPR) aktiviert werden kann. Eine Rolle von ADPR als sekundärer Botenstoff in der Aktivierung des Ca^{2+} -Einstroms wird seit einigen Jahren diskutiert. Für die Analyse des putativen Signalwegs standen bisher keine ausreichend spezifischen Pharmaka zur Verfügung. In der vorliegenden Arbeit wurde im Patch-clamp-Experiment die endogene Expression von TRPM2 in Jurkat T-Lymphozyten bestätigt. In diesem System wurde die Wirkung des NAD-Glykohydrolase-Inhibitors 3GA, sowie von 8-Br-ADPR auf TRPM2 untersucht. Während 3GA in Konzentrationen, die die zelluläre Bildung von ADPR inhibieren, keinen Einfluß auf die Aktivierung von TRPM2 hatte, inhibierte 8-Br-ADPR die ADPR-vermittelte Aktivierung von TRPM2 vollständig. Zusammenfassend stehen mit 3GA und 8-Br-ADPR erstmals zwei Pharmaka zur Verfügung, die die Unterbrechung eines möglichen ADPR/TRPM2-Signalweges an unterschiedlichen Stellen erlauben. In Zukunft sollen diese Substanzen für die Untersuchung der Beteiligung dieses Signalweges an physiologischen Vorgängen eingesetzt werden.

Die potentielle Rolle von TRPM-Kanälen in vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen macht sie zu vielversprechenden Zielen für die Entwicklung neuer therapeutischer Pharmaka. Die Teilprojekte zu TRPM4 und TRPM2 tragen zu unserem Verständnis der Rolle der sehr heterogenen Familie der TRPM-Kanäle an der Modulation des zellulären Ca^{2+} -Signals bei. Die funktionellen Unterschiede zwischen TRPM4a und TRPM4b machen deutlich, wie wichtig dabei das Wissen um Expression und Eigenschaften von Splicevarianten ist. Aufgrund des Fehlens von spezifischen Inhibitoren und Agonisten hat sich unser Wissen über TRPM-Kanäle bislang im wesentlichen auf Erkenntnisse aus Überexpressionsstudien beschränkt. Die Verwendung spezifischer Inhibitoren wie 3GA und 8-Br-ADPR wird in Zukunft die Analyse der Rolle von TRPM-Kanälen und der an ihrer Aktivierung beteiligten Signaltransduktionswege in intakten Zellen und nativen Geweben ermöglichen.

7 Abstract

TRPM2 and TRPM4 are members of the family of melastatin related TRP channels. Multiple alternative transcripts have been described for the human TRPM4 gene (Xu et al., 2001; Launay et al., 2002). The full length transcript TRPM4b is a Ca^{2+} activated, voltage dependent nonselective cation channel not permeable to Ca^{2+} (Launay et al., 2002; Nilius et al., 2003). Little is known of the other splice variants.

In the present work the expression of TRPM4 splice variants in the human cell line HEK-293 was analysed. Coexpression of TRPM4a and TRPM4c was shown using RT-PCR. Endogenous proteins could not be detected by Western blot demonstrating the suitability of the HEK cell system for overexpression analysis, despite positive results in RT-PCR for TRPM mRNA were obtained. The cDNA of TRPM4a was cloned from HEK-293 cells by RT-PCR. Starting from the TRPM4a cDNA, expression vectors for TRPM4b and TRPM4c were constructed using cloning techniques based on PCR. All three isoforms were expressed as EGFP fusion proteins and the intracellular localisation was determined by confocal fluorescence microscopy. While TRPM4b was localised in the plasmamembrane of the cell, TRPM4a and TRPM4c were found mainly in the ER. For the functional analysis stable cell lines expressing TRPM4a and TRPM4b were established by transfection and cloning by limiting dilution. In cell lines stably expressing the transcript for TRPM4c no respective protein could be detected. In contrast in cell lines stably expressing TRPM4b expression and localisation could be confirmed by patch clamp experiments.

The impact of TRPM4b on membrane potential and Ca^{2+} signaling was investigated using fluorimetric techniques. In HEK-293 cells the expression of TRPM4b reduced the depolarisation of the plasma membrane in conjunction with Ca^{2+} entry induced either by the Ca^{2+} ionophore ionomycin or by stimulation of the ACh receptor with carbachol. This resulted in a larger Ca^{2+} entry as compared to the wild-type cells, indicating that in cells with a less negative membrane potential (about -15 to -30 mV for HEK-293 cells) TRPM4b can act as a positive regulator of Ca^{2+} entry.

In cells expressing TRPM4a stimulation with ATP, an agonist of the purinergic P2Y receptor, released a greater portion from the intracellular Ca^{2+} pool as compared to wild-type cells. Ca^{2+} release by Ins-1,4,5- P_3 was investigated in permeabilised cells. The impact of TRPM4a was only detectable if K^+ was exchanged for Cs^+ or specific Ca^{2+} activated potassium channels were blocked by apamin. These results indicated that TRPM4a contributed to Ca^{2+} release from intracellular stores by preventing a rise in ER membrane potential. In conclusion

it was demonstrated that the TRPM4 splice variants TRPM4a and TRPM4b are modulators of cellular Ca^{2+} signaling. The impact on Ca^{2+} signaling depends on the intracellular localization of the ion channel. TRPM4b in the plasma membrane does either increase or decrease Ca^{2+} entry depending on the resting membrane potential of the cell, whereas TRPM4a in the ER facilitates Ca^{2+} release from intracellular stores.

TRPM2 is an ion channel permeable to Ca^{2+} and Na^+ that can be activated by adenosine diphosphoribose (ADPR). A potential role of ADPR as a second messenger mediating Ca^{2+} entry into cells has been discussed for some years. Specific pharmacological tools for the dissection of the pathway were not available until now. In the present work the functional expression of TRPM2 in Jurkat T lymphocytes was confirmed by patch clamp analysis. Using this system a potential action of 8-Br-ADPR and the NAD glycohydrolase inhibitor 3GA on TRPM2 activation was investigated. Concentrations of 3GA that completely blocked cellular synthesis of ADPR did not effect the activation of TRPM2, whereas 8-Br-ADPR almost completely inhibited the activation of TRPM2 by ADPR. Thus, with 3GA and 8-Br-ADPR represent the first specific pharmacological tools that allow interference at different stages of a potential ADPR/TRPM2 signal transduction pathway. In the future these substances will be used to investigate the potential role of this signal transduction pathway in physiological processes.

The potential role of TRPM channels in many physiological and pathophysiological processes makes them promising targets for future drug development. The projects on TRPM4 and TRPM2 increased our knowledge about the role of the very heterogeneous family of TRPM channels in the modulation of Ca^{2+} signaling. The functional differences between TRPM4a and TRPM4b indicate the importance of the understanding of expression and function of splice variants. Because of the lack of specific pharmacological tools our knowledge on TRPM channels was mostly limited to overexpression studies. New specific pharmacological tools like 3GA and 8-Br-ADPR open up the possibility to investigate the role of TRPM channels and the signal transduction pathways involved in their activation in intact cells and native tissues.

8 Literaturverzeichnis

- ABRAHAM, R. UND WEISS, A. (2004). Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nat. Rev. Immunol.*, 4: 301–308.
- ADEBANJO, O. A.; KOVAL, A.; MOONGA, B. S.; WU, X. B.; YAO, S.; BEVIS, P. J.; KUMEGAWA, M.; ZAIDI, M. UND SUN, L. (2000). Molecular cloning, expression, and functional characterization of a novel member of the CD38 family of ADP-ribosyl cyclases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 273: 884–889.
- AIDLEY, D. UND STANFIELD, P. (1996). *Ion Channels. Molecules in action*. Cambridge University Press, Cambridge, 1. Auflage.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. UND WALTER, P. (2002). *Molecular biology of the cell*. Garland Science, New York, 4. Auflage.
- ANCELLIN, N.; PREISSNER, L.; LE MAOUT, S.; BARBADO, M.; CREMINON, C.; CORMAN, B. UND MOREL, A. (1999). Homologous and heterologous phosphorylation of the vasopressin V1a receptor. *Cell. Signal.*, 11: 743–751.
- AUSUBEL, F.; BRENT, R.; KINGSTON, R.; MOORE, D.; SEIDMAN, J.; SMITH, J. UND STRUHL, K. (1995). *Short Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York, 3. Auflage.
- BARRITT, G. (1999). Receptor-activated Ca^{2+} inflow in animal cells: a variety of pathways tailored to meet different intracellular Ca^{2+} signalling requirements. *Biochem. J.*, 337: 153–169.
- BENSON, D. A.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D. J.; OSTELL, J. UND WHEELER, D. L. (2005). GenBank. *Nucleic Acids Res.*, 33: D34–D38.
- BERGENHEM, N.; VENTA, P.; HOPKINS, P.; KIM, H. UND TASHIAN, R. (1992). Mutation creates an open reading frame within the 5' untranslated region of macaque erythrocyte carbonic anhydrase (CA) I mRNA that suppresses CA I expression and supports the scanning model for translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 8798–8802.
- BERRIDGE, M. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, 361: 315–325.
-

- BERRIDGE, M.; LIPP, P. UND BOOTMAN, M. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 1: 11–21.
- BLOOMQUIST, B.; SHORTRIDGE, R.; SCHNEUWLY, S.; PERDEW, M.; MONTELL, C.; STELLER, H.; RUBIN, G. UND PAK, W. (1988). Isolation of a putative phospholipase C gene of *Drosophila*, *norpA*, and its role in phototransduction. *Cell*, 54: 723–733.
- CARAFOLI, E. (2003). The calcium-signalling saga: tap water and protein crystals. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 4: 326–332.
- CHAN, W.; SOLOVIEV, M.; CIRUELA, F. UND MCILHINNEY, R. (2001). Molecular determinants of metabotropic glutamate receptor 1B trafficking. *Mol. Cell. Neurosci.*, 17: 577–588.
- CHOI, J. S.; KIM, J. S.; JOE, C. O.; KIM, S.; HA, K. S. UND PARK, Y. M. (1999). Improved cycle sequencing of GC-rich DNA template. *Exp. Mol. Med.*, 31: 20–24.
- CHUBANOV, V.; GUDERMANN, T. UND SCHLINGMANN, K. (2005). Essential role for TRPM6 in epithelial magnesium transport and body magnesium homeostasis. *Pflügers Arch.*, 451: 228–234.
- CHUBANOV, V.; WALDEGGER, S.; MEDEROS Y SCHNITZLER, M.; VITZTHUM, H.; SASSEN, M.; SEYBERTH, H.; KONRAD, M. UND GUDERMANN, T. (2004). Disruption of TRPM6/TRPM7 complex formation by a mutation in the TRPM6 gene causes hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 2894–2899.
- CLAPHAM, D.; MONTELL, C.; SCHULTZ, G. UND JULIUS, D. (2003). International Union of Pharmacology. XLIII. Compendium of voltage-gated ion channels: transient receptor potential channels. *Pharmacol. Rev.*, 55: 591–596.
- CLAPHAM, D. E.; RUNNELS, L. W. UND STRUBING, C. (2001). The TRP ion channel family. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2: 387–396.
- COLQUHOUN, D.; NEHER, E.; REUTER, H. UND STEVENS, C. (1981). Inward current channels activated by intracellular Ca^{2+} in cultured cardiac cells. *Nature*, 294: 752–754.
- COSENS, D. UND MANNING, A. (1969). Abnormal electroretinogram of a *Drosophila* mutant. *Nature*, 224: 285–287.
- CURTIS, H. UND COLE, K. (1942). Membrane resting and action potentials in giant fibers of squid nerve. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 19: 135–144.
- DAMMERMANN, W. UND GUSE, A. (2005). Functional ryanodine receptor expression is required for NAADP-mediated local Ca^{2+} signaling in T-lymphocytes. *J. Biol. Chem.*, 280: 21394–21399.
-

- DAVIES, E. UND HALLETT, M. (1998). High micromolar Ca^{2+} beneath the plasma membrane in stimulated neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 248: 679–683.
- DE FLORA, A.; GUIDA, L.; FRANCO, L. UND ZOCCHI, E. (1997). The CD38/cyclic ADP-ribose system: a topological paradox. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 29: 1149–1166.
- DOLMETSCH, R.; XU, K. UND LEWIS, R. (1998). Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature*, 392: 933–936.
- DUNCAN, L.; DEEDS, J.; HUNTER, J.; SHAO, J.; HOLMGREN, L.; WOOLF, E.; TEPPER, R. UND SHYJAN, A. (1998). Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer Res.*, 58: 1515–1520.
- EARLEY, S.; WALDRON, B. UND BRAYDEN, J. (2004). Critical role for transient receptor potential channel TRPM4 in myogenic constriction of cerebral arteries. *Circ. Res.*, 95: 922–9.
- ELLSGAARD, L. UND HELENIUS, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 4: 181–91.
- EPPS, D. E.; WOLFE, M. L. UND GROPPI, V. (1994). Characterization of the steady-state and dynamic fluorescence properties of the potential-sensitive dye bis-(1,3-dibutylbarbituric acid)trimethine oxonol (DiBAC4(3)) in model systems and cells. *Chem. Phys. Lipids*, 69: 137–150.
- ERDAHL, W.; CHAPMAN, C.; TAYLOR, R. UND PFEIFFER, D. (1994). Ca^{2+} transport properties of ionophores A23187, ionomycin, and 4-BrA23187 in a well defined model system. *Biophys. J.*, 66: 1678–1693.
- FANGER, C.; HOTH, M.; CRABTREE, G. UND LEWIS, R. (1995). Characterization of T cell mutants with defects in capacitative calcium entry: genetic evidence for the physiological roles of CRAC channels. *J. Cell Biol.*, 131: 655–667.
- FANGER, C.; RAUER, H.; NEBEN, A.; MILLER, M.; RAUER, H.; WULFF, H.; ROSA, J.; GANELLIN, C.; CHANDY, K. UND CAHALAN, M. (2001). Calcium-activated potassium channels sustain calcium signaling in T lymphocytes. Selective blockers and manipulated channel expression levels. *J. Biol. Chem.*, 276: 12249–12256.
- FASOLATO, C. UND POZZAN, T. (1989). Effect of membrane potential on divalent cation transport catalyzed by the 'electroneutral' ionophores A23187 and ionomycin. *J. Biol. Chem.*, 264: 19630–19636.
- FISCHER, W.; FRANKE, H.; GROGER-ARNDT, H. UND ILLES, P. (2005). Evidence for the existence of P2Y(1,2,4) receptor subtypes in HEK-293 cells: reactivation of P2Y(1)
-

- receptors after repetitive agonist application. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 371: 466–472.
- FISKUM, G. (1985). Intracellular levels and distribution of Ca^{2+} in digitonin-permeabilized cells. *Cell Calcium*, 6: 25–37.
- FLEIG, A. UND PENNER, R. (2004a). Emerging roles of TRPM channels. *Novartis Found. Symp.*, 258: 248–266.
- FLEIG, A. UND PENNER, R. (2004b). The TRPM ion channel subfamily: molecular, biophysical and functional features. *Trends Pharmacol. Sci.*, 25: 633–639.
- FLIEGERT, R. (1999). *Untersuchungen zur Wirkung von Nucleotidanaloga auf den $c\text{ADPR}/\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg in T-Lymphozyten*. Diplomarbeit, Universität Hamburg.
- FURUICHI, T.; YOSHIKAWA, S.; MIYAWAKI, A.; WADA, K.; MAEDA, N. UND MIKOSHIBA, K. (1989). Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate-binding protein P400. *Nature*, 342: 32–38.
- GALIONE, A.; LEE, H. C. UND BUSA, W. B. (1991). Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in sea urchin egg homogenates: modulation by cyclic ADP-ribose. *Science*, 253: 1143–1146.
- GALLAGHER, S. (1995). Quantification of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. In AUSUBEL, F.; BRENT, R.; KINGSTON, R.; MOORE, D.; SEIDMAN, J.; SMITH, J. UND STRUHL, K. (Herausgeber), *Current protocols in molecular biology.*, Band 3, A.3D.1–A.3D.8. John Wiley and Sons.
- GARCIA-SANZ, N.; FERNANDEZ-CARVAJAL, A.; MORENILLA-PALAO, C.; PLANELLAS-CASES, R.; FAJARDO-SANCHEZ, E.; FERNANDEZ-BALLESTER, G. UND FERRER-MONTIEL, A. (2004). Identification of a tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor. *J. Neurosci.*, 24: 5307–5314.
- GASSER, A. UND GUSE, A. (2005). Determination of intracellular concentrations of the TRPM2 agonist ADP-ribose by reversed-phase HPLC. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 821: 181–187.
- GEBAUER, M. (2003). *Untersuchung der Inaktivierung des humanen $K_V4.2$ -Kanals und der Effekte von K_V -Kanal-interagierenden Proteinen (KChIPs)*. Doktorarbeit, Universität Hamburg.
- GLUZMAN, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*, 23: 175–82.
- GOMPERTS, B.; KRAMER, I. UND TATHAM, P. (2003). *Signal transduction*. Academic Press, London, 1. Auflage.
-

- GRAHAM, F. L.; SMILEY, J.; RUSSELL, W. C. UND NAIRN, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.*, 36: 59–74.
- GRIMM, C.; KRAFT, R.; SAUERBRUCH, S.; SCHULTZ, G. UND HARTENECK, C. (2003). Molecular and functional characterization of the melastatin-related cation channel TRPM3. *J. Biol. Chem.*, 278: 21493–21501.
- GRIMM, C.; KRAFT, R.; SCHULTZ, G. UND HARTENECK, C. (2005). Activation of the melastatin-related cation channel TRPM3 by D-erythro-sphingosine. *Mol. Pharmacol.*, 67: 798–805.
- GRYNKIEWICZ, G.; POENIE, M. UND TSIEN, R. (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, 260: 3440–3450.
- GUDERMANN, T. UND FLOCKERZI, V. (2005). TRP channels as new pharmacological targets. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 371: 241–244.
- GUINAMARD, R.; CHATELIER, A.; DEMION, M.; POTREAU, D.; PATRI, S.; RAHMATI, M. UND BOIS, P. (2004). Functional characterization of a Ca^{2+} -activated non-selective cation channel in human atrial cardiomyocytes. *J. Physiol.*, 558: 75–83.
- GUKOVSKAYA, A. UND ZINCHENKO, V. (1985). The effects of ionophore A23187 and concanavalin A on the membrane potential of human peripheral blood lymphocytes and rat thymocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 815: 433–440.
- GUSE, A. (2004). Biochemistry, biology, and pharmacology of cyclic adenosine diphosphoribose (cADPR). *Curr. Med. Chem.*, 11: 847–855.
- HALL, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, 41: 95–98.
- HAMILL, O.; MARTY, A.; NEHER, E.; SAKMANN, B. UND SIGWORTH, F. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.*, 391: 85–100.
- HARA, Y.; WAKAMORI, M.; ISHII, M.; MAENO, E.; NISHIDA, M.; YOSHIDA, T.; YAMADA, H.; SHIMIZU, S.; MORI, E.; KUDOH, J.; SHIMIZU, N.; KUROSE, H.; OKADA, Y.; IMOTO, K. UND MORI, Y. (2002). LTRPC2 Ca^{2+} -permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol. Cell*, 9: 163–173.
- HARDIE, R. UND MINKE, B. (1992). The *trp* gene is essential for a light-activated Ca^{2+} channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron*, 8: 643–651.
-

- HARDIE, R. UND RAGHU, P. (2001). Visual transduction in *Drosophila*. *Nature*, 413: 186–193.
- HARTENECK, C. (2005). Function and pharmacology of TRPM cation channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 371: 307–314.
- HAUBER, M. (2003). *Spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle in GH3/B6-Zellen*. Doktorarbeit, Universität Hamburg.
- HEINER, I.; EISFELD, J.; HALASZOVICH, C.; WEHAGE, E.; JUNGLING, E.; ZITT, C. UND LÜCKHOFF, A. (2003). Expression profile of the transient receptor potential (TRP) family in neutrophil granulocytes: evidence for currents through long TRP channel 2 induced by ADP-ribose and NAD. *Biochem. J.*, 371: 1045–1053.
- HEINER, I.; RADUKINA, N.; EISFELD, J.; KUHN, F. UND LÜCKHOFF, A. (2005). Regulation of TRPM2 channels in neutrophil granulocytes by ADP-ribose: a promising pharmacological target. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 371: 325–333.
- HELLWIG, N.; ALBRECHT, N.; HARTENECK, C.; SCHULTZ, G. UND SCHAEFER, M. (2005). Homo- and heteromeric assembly of TRPV channel subunits. *J. Cell Sci.*, 118: 917–928.
- HILL, K.; BENHAM, C.; MCNULTY, S. UND RANDALL, A. (2004). Flufenamic acid is a pH-dependent antagonist of TRPM2 channels. *Neuropharmacology*, 47: 450–460.
- HIRSCHBERG, K.; MILLER, C.; ELLENBERG, J.; PRESLEY, J.; SIGGIA, E.; PHAIR, R. UND LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. (1998). Kinetic analysis of secretory protein traffic and characterization of golgi to plasma membrane transport intermediates in living cells. *J. Cell Biol.*, 143: 1485–1503.
- HODGKIN, A. UND HUXLEY, A. (1939). Action potentials recorded from inside a nerve fibre. *Nature*, 140: 710–711.
- HODGKIN, A. UND HUXLEY, A. (1952). Currents carries by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.*, 116: 449–472.
- HOFMANN, T.; CHUBANOV, V.; GUDERMANN, T. UND MONTELL, C. (2003). TRPM5 is a voltage-modulated and Ca^{2+} -activated monovalent selective cation channel. *Curr. Biol.*, 13: 1153–1158.
- HOHENEGGER, M.; SUKO, J.; GSCHIEDLINGER, R.; DROBNY, H. UND ZIDAR, A. (2002). Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate, NAADP, activates the skeletal muscle ryanodine receptor. *Biochem. J.*, 367: 423–431.
- HOTH, M. UND PENNER, R. (1992). Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature*, 355: 353–356.
-

- JIANG, B.; SUN, X.; CAO, K. UND WANG, R. (2002). Endogenous K_V channels in human embryonic kidney (HEK-293) cells. *Mol. Cell. Biochem.*, 238: 69–79.
- JOSEPH, S. UND WILLIAMSON, J. (1986). Characteristics of inositol trisphosphate-mediated Ca^{2+} release from permeabilized hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, 261: 14658–14664.
- KEDEI, N.; SZABO, T.; LILE, J.; TREANOR, J.; OLAH, Z.; IADAROLA, M. UND BLUMBERG, P. (2001). Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *J. Biol. Chem.*, 276: 28613–28619.
- KIM, U.-H.; KIM, M.-K.; KIM, J.-S.; HAN, M.-K.; PARK, B.-H. UND KIM, H.-R. (1993). Purification and characterization of NAD glycohydrolase from rabbit erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 350: 147–152.
- KIRK, C.; CREBA, J.; DOWNES, C. UND MICHELL, R. (1981). Hormone-stimulated metabolism of inositol lipids and its relationship to hepatic receptor function. *Biochem. Soc. Trans.*, 9: 377–379.
- KISHIMOTO, A.; TAKAI, Y.; MORI, T.; KIKKAWA, U. UND NISHIZUKA, Y. (1980). Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover. *J. Biol. Chem.*, 255: 2273–2276.
- KOLISEK, M.; BECK, A.; FLEIG, A. UND PENNER, R. (2005). Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels. *Mol. Cell*, 18: 61–69.
- KOZAK, M. (1987). Effects of intercistronic length on the efficiency of reinitiation by eucaryotic ribosomes. *Mol. Cell. Biol.*, 7: 3438–3445.
- KRAFT, R. UND HARTENECK, C. (2005). The mammalian melastatin-related transient receptor potential cation channels: an overview. *Pflügers Arch.*, 451: 204–211.
- KRASZNAI, Z. (2005). Ion channels in T cells: from molecular pharmacology to therapy. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*, 53: 127–135.
- LAEMMLI, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680–685.
- LANGHORST, M.; SCHWARZMANN, N. UND GUSE, A. (2004). Ca^{2+} release via ryanodine receptors and Ca^{2+} entry: major mechanisms in NAADP-mediated Ca^{2+} signaling in T-lymphocytes. *Cell. Signal.*, 16: 1283–1289.
- LAUNAY, P.; CHENG, H.; SRIVATSAN, S.; PENNER, R.; FLEIG, A. UND KINET, J. P. (2004). TRPM4 regulates calcium oscillations after T cell activation. *Science*, 306: 1374–1377.
-

- LAUNAY, P.; FLEIG, A.; PERRAUD, A. L.; SCHARENBERG, A. M.; PENNER, R. UND KINET, J. P. (2002). TRPM4 is a Ca^{2+} -activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization. *Cell*, 109: 397–407.
- LEE, H. C. UND AARHUS, R. (1991). ADP-ribosyl cyclase: an enzyme that cyclizes NAD^+ into a calcium-mobilizing metabolite. *Cell. Regul.*, 2: 203–209.
- LEE, Y.; SAYEED, M. UND WURSTER, R. (1993). Inhibition of cell growth by K^+ channel modulators is due to interference with agonist-induced Ca^{2+} release. *Cell. Signal.*, 5: 803–809.
- LEWIS, R. UND CAHALAN, M. (1989). Mitogen-induced oscillations of cytosolic Ca^{2+} and transmembrane Ca^{2+} current in human leukemic T cells. *Cell. Regul.*, 1: 99–112.
- LI, P.-L.; ZHANG, D.; GE, Z.-D. UND CAMPBELL, W. (2002). Role of ADP-ribose in 11,12-EET-induced activation of K_{Ca} channels in coronary arterial smooth muscle cells. *Am.J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 282: H1229–H1236.
- LI, S.; GOSLING, M.; POLL, C.; WESTWICK, J. UND COX, B. (2004). Therapeutic scope of modulation of non-voltage-gated cation channels. *Drug Discov. Today*, 9: 1045–1054.
- LIS, A.; WISSENBACH, U. UND PHILIPP, S. (2005). Transcriptional regulation and processing increase the functional variability of TRPM channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 371: 315–324.
- MA, D.; ZERANGUE, N.; LIN, Y.; COLLINS, A.; YU, M.; JAN, Y. UND JAN, L. (2001). Role of ER export signals in controlling surface potassium channel numbers. *Science*, 291: 316–319.
- MA, D.; ZERANGUE, N.; RAAB-GRAHAM, K.; FRIED, S.; JAN, Y. UND JAN, L. (2002). Diverse trafficking patterns due to multiple traffic motifs in G protein-activated inwardly rectifying potassium channels from brain and heart. *Neuron*, 33: 715–729.
- MACLENNAN, D.; BRANDL, C.; KORCZAK, B. UND GREEN, N. (1985). Amino-acid sequence of a $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ -dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. *Nature*, 316: 696–700.
- MARHL, M.; SCHUSTER, S.; BRUMEN, M. UND HEINRICH, R. (1997). Modeling the interrelations between the calcium oscillations and ER membrane potential oscillations. *Biophys. Chem.*, 63: 221–239.
- MARHL, M.; SCHUSTER, S.; BRUMEN, M. UND HEINRICH, R. (1998). Modelling oscillations of calcium and the endoplasmatic reticulum transmembrane potential. Role of the signalling and buffering proteins and of the size of the Ca^{2+} sequestering ER subcompartments. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 46: 79–90.
-

- MCHUGH, D.; FLEMMING, R.; XU, S.; PERRAUD, A. UND BEECH, D. (2003). Critical intracellular Ca^{2+} dependence of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) cation channel activation. *J. Biol. Chem.*, 278: 11002–11006.
- McKEMY, D.; NEUHAUSSER, W. UND JULIUS, D. (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*, 416: 52–58.
- MELDOLESI, J. UND POZZAN, T. (1998). The endoplasmic reticulum Ca^{2+} store: a view from the lumen. *Trends Biochem. Sci.*, 23: 10–14.
- MESZAROS, L. G.; BAK, J. UND CHU, A. (1993). Cyclic ADP-ribose as an endogenous regulator of the non-skeletal type ryanodine receptor Ca^{2+} channel. *Nature*, 364: 76–79.
- MITCHELL, R.; SIMMERMAN, H. UND JONES, L. (1988). Ca^{2+} binding effects on protein conformation and protein interactions of canine cardiac calsequestrin. *J. Biol. Chem.*, 263: 1376–1381.
- MONTELL, C. (2003). Mg^{2+} homeostasis: the Mg^{2+} -sensitive TRPM channels. *Curr. Biol.*, 13: R799–R801.
- MONTELL, C. UND RUBIN, G. (1989). Molecular characterization of the *Drosophila* *trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*, 2: 1313–1323.
- MORGAN, A. UND JACOB, R. (1994). Ionomycin enhances Ca^{2+} influx by stimulating store-regulated cation entry and not by a direct action at the plasma membrane. *Biochem. J.*, 300: 665–672.
- MUALLEM, S.; SCHOEFFIELD, M.; PANDOL, S. UND SACHS, G. (1985). Inositol trisphosphate modification of ion transport in rough endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 4433–4437.
- NEHER, E. UND SAKMANN, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, 260: 799–802.
- NELSON, M. UND MCCLELLAND, M. (1992). Use of DNA methyltransferase/endonuclease enzyme combinations for megabase mapping of chromosomes. *Methods Enzymol.*, 216: 279–303.
- NGUYEN, T.; CHIN, W. UND VERDUGO, P. (1998). Role of $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^{+}$ ion exchange in intracellular storage and release of Ca^{2+} . *Nature*, 395: 908–912.
- NIEMEYER, B.; SUZUKI, E.; SCOTT, K.; JALINK, K. UND ZUKER, C. (1996). The *Drosophila* light-activated conductance is composed of the two channels TRP and TRPL. *Cell*, 85: 651–659.
-

- NILIUS, B.; PRENEN, J.; DROOGMANS, G.; VOETS, T.; VENNEKENS, R.; FREICHEL, M.; WISSENBAACH, U. UND FLOCKERZI, V. (2003). Voltage dependence of the Ca^{2+} -activated cation channel TRPM4. *J. Biol. Chem.*, 278: 30813–30820.
- NILIUS, B.; PRENEN, J.; TANG, J.; WANG, C.; OWSIANIK, G.; JANSSENS, A.; VOETS, T. UND ZHU, M. X. (2005a). Regulation of the Ca^{2+} sensitivity of the nonselective cation channel trpm4. *J. Biol. Chem.*, 280: 6423–6433.
- NILIUS, B.; PRENEN, J.; ULLRICH, N.; VOETS, T. UND DROOGSMANS, G. (2004a). TRPM4 and TRPM5: comparing siblings. In *Long, strange TRPs: properties and functions of TRPM and related channels*. University of Glasgow.
- NILIUS, B.; PRENEN, J.; VOETS, T. UND DROOGMANS, G. (2004b). Intracellular nucleotides and polyamines inhibit the Ca^{2+} -activated cation channel TRPM4b. *Pflügers Arch.*, 448: 70–75.
- NILIUS, B.; TALAVERA, K.; OWSIANIK, G.; PRENEN, J.; DROOGMANS, G. UND VOETS, T. (2005b). Gating of TRP channels: a voltage connection? *J. Physiol.*, 567: 35–44.
- NILIUS, B.; VIANA, F. UND DROOGSMANS, G. (1997). Ion channels in vascular endothelium. *Annu. Rev. Physiol.*, 59: 145–170.
- OKABE, E.; TSUJIMOTO, Y. UND KOBAYASHI, Y. (2000). Calmodulin and cyclic adp-ribose interaction in Ca^{2+} signaling related to cardiac sarcoplasmic reticulum: superoxide anion radical-triggered Ca^{2+} release. *Antioxid. Redox Signal.*, 2: 47–54.
- O’KELLY, I.; BUTLER, M.; ZILBERBERG, N. UND GOLDSTEIN, S. (2002). Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell*, 111: 577–588.
- O’ROURKE, F.; SOONS, K.; FLAUMENHAUFT, R.; WATRAS, J.; BAIO-LARUE, C.; MATTHEWS, E. UND FEINSTEIN, M. (1994). Ca^{2+} release by inositol 1,4,5-trisphosphate is blocked by the K^{+} -channel blockers apamin and tetrapentylammonium ion, and a monoclonal antibody to a 63 kDa membrane protein: reversal of blockade by K^{+} ionophores nigericin and valinomycin and purification of the 63 kDa antibody-binding protein. *Biochem. J.*, 300: 673–683.
- PAREKH, A. UND PUTNEY, J., JR (2005). Store-operated calcium channels. *Physiol. Rev.*, 85: 757–810.
- PARTISETI, M.; LE DEIST, F.; HIVROZ, C.; FISCHER, A.; KORN, H. UND CHOQUET, D. (1994). The calcium current activated by T cell receptor and store depletion in human lymphocytes is absent in a primary immunodeficiency. *J. Biol. Chem.*, 269: 32327–32335.
-

- PATTON, C.; THOMPSON, S. UND EPEL, D. (2004). Some precautions in using chelators to buffer metals in biological solutions. *Cell Calcium*, 35: 427–431.
- PENNER, R. UND FLEIG, A. (2004). Store-operated calcium entry: a tough nut to CRAC. *Sci. STKE*, 2004: pe38.
- PERI, S. UND PANDEY, A. (2001). A reassessment of the translation initiation codon in vertebrates. *Trends Genet.*, 17: 685–687.
- PERRAUD, A. L.; FLEIG, A.; DUNN, C. A.; BAGLEY, L. A.; LAUNAY, P.; SCHMITZ, C.; STOKES, A. J.; ZHU, Q.; BESSMAN, M. J.; PENNER, R.; KINET, J. P. UND SCHARENBERG, A. M. (2001). ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by nudix motif homology. *Nature*, 411: 595–599.
- PESSAH, I.; WATERHOUSE, A. UND CASIDA, J. (1985). The calcium-ryanodine receptor complex of skeletal and cardiac muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 128: 449–456.
- PETERSEN, C.; BERRIDGE, M.; BORGESE, M. UND BENNETT, D. (1995). Putative capacitative calcium entry channels: expression of *Drosophila* trp and evidence for the existence of vertebrate homologues. *Biochem. J.*, 311: 41–44.
- PETERSEN, O. H. (2002). Cation channels: homing in on the elusive CAN channels. *Curr. Biol.*, 12: R520–R522.
- PHILLIPS, A.; BULL, A. UND KELLY, L. (1992). Identification of a *Drosophila* gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the trp phototransduction gene. *Neuron*, 8: 631–642.
- PRAWITT, D.; ENKLAAR, T.; KLEMM, G.; GARTNER, B.; SPANGENBERG, C.; WINTERPACHT, A.; HIGGINS, M.; PELLETIER, J. UND ZABEL, B. (2000). Identification and characterization of MTR1, a novel gene with homology to melastatin (MLSN1) and the trp gene family located in the BWS-WT2 critical region on chromosome 11p15.5 and showing allele-specific expression. *Hum. Mol. Genet.*, 9: 203–216.
- PRAWITT, D.; MONTEILH-ZOLLER, M. K.; BRIKEL, L.; SPANGENBERG, C.; ZABEL, B.; FLEIG, A. UND PENNER, R. (2003). TRPM5 is a transient Ca^{2+} -activated cation channel responding to rapid changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 15166–15171.
- PUCK, T.; CIECIURA, S. UND ROBINSON, A. (1958). Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J. Exp. Med.*, 108: 945–956.
- PUTNEY, J., JR (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*, 7: 1–12.
-

- PUTNEY, J., JR UND RIBEIRO, C. (2000). Signaling pathways between the plasma membrane and endoplasmic reticulum calcium stores. *Cell. Mol. Life Sci.*, 57: 1272–1286.
- RANDRIAMAMPITA, C. UND TRAUTMANN, A. (2004). Ca^{2+} signals and T lymphocytes: New mechanisms and functions in Ca^{2+} signalling. *Biol. Cell*, 96: 69–78.
- REID, E.; DEARLOVE, A.; OSBORN, O.; ROGERS, M. UND RUBINSZTEIN, D. (2000). A locus for autosomal dominant 'pure' hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 19q13. *Am. J. Hum. Genet.*, 66: 728–732.
- RICH, T. UND LANGER, G. (1975). A comparison of excitation-contraction coupling in heart and skeletal muscle: an examination of 'calcium-induced calcium-release'. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 7: 747–765.
- ROZEN, S. UND SKALETZKY, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.*, 132: 365–386.
- SANO, Y.; INAMURA, K.; MIYAKE, A.; MOCHIZUKI, S.; YOKOI, H.; MATSUSHIME, H. UND FURUICHI, K. (2001). Immunocyte Ca^{2+} influx system mediated by LTRPC2. *Science*, 293: 1327–1330.
- SCHARENBERG, A. (2005). TRPM2 and TRPM7: channel/enzyme fusions to generate novel intracellular sensors. *Pflügers Arch.*, 451: 220–227.
- SCHLINGMANN, K.; WEBER, S.; PETERS, M.; NIEMANN NEJSUM, L.; VITZTHUM, H.; KLINGEL, K.; KRATZ, M.; HADDAD, E.; RISTOFF, E.; DINOUR, D.; SYRROU, M.; NIELSEN, S.; SASSEN, M.; WALDEGGER, S.; SEYBERTH, H. UND KONRAD, M. (2002). Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family. *Nat. Genet.*, 31: 166–170.
- SCHMITZ, C.; PERRAUD, A.; JOHNSON, C.; INABE, K.; SMITH, M.; PENNER, R.; KUROSAKI, T.; FLEIG, A. UND SCHARENBERG, A. (2003). Regulation of vertebrate cellular Mg^{2+} homeostasis by TRPM7. *Cell*, 114: 191–200.
- SCHNEIDER, U.; SCHWENK, H. UND BORNKAMM, G. (1977). Characterization of EBV-genome negative nulländ Tcell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int. J. Cancer*, 19: 621–626.
- SCOTT, D.; BLANPIED, T.; SWANSON, G.; ZHANG, C. UND EHLERS, M. (2001). An NMDA receptor ER retention signal regulated by phosphorylation and alternative splicing. *J. Neurosci.*, 21: 3063–3072.
- SERAFINI, A.; LEWIS, R.; CLIPSTONE, N.; BRAM, R.; FANGER, C.; FIERING, S.; HERZENBERG, L. UND CRABTREE, G. (1995). Isolation of mutant T lymphocytes with defects in capacitative calcium entry. *Immunity*, 3: 239–250.
-

- SHAH, J.; COHEN, R. UND PANT, H. (1987). Inositol trisphosphate-induced calcium release in brain microsomes. *Brain Res.*, 419: 1–6.
- SHAH, J. UND PANT, H. (1988). Potassium-channel blockers inhibit inositol trisphosphate-induced calcium release in the microsomal fractions isolated from the rat brain. *Biochem. J.*, 250: 617–620.
- SHIMAMURA, K.; ZHOU, M.; ITO, Y.; KIMURA, S.; ZOU, L.; SEKIGUCHI, F.; KITRAMURA, K. UND SUNANO, S. (2002). Effects of flufenamic acid on smooth muscle of the carotid artery isolated from spontaneously hypertensive rats. *J. Smooth Muscle Res.*, 38: 39–50.
- SMITH, A. UND KLUGMAN, K. (1998). Fusion PCR, a one-step variant of the 'megaprimer' method of mutagenesis. *Biotechniques*, 24: 736–742.
- STEIN, J.; MULLIKEN, J.; STAL, S.; GASSER, D.; MALCOLM, S.; WINTER, R.; BLANTON, S.; AMOS, C.; SEEMANOVA, E. UND HECHT, J. (1995). Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: evidence of linkage to BCL3 in 17 multigenerational families. *Am. J. Hum. Genet.*, 57: 257–272.
- STREB, H.; IRVINE, R.; BERRIDGE, M. UND SCHULZ, I. (1983). Release of Ca^{2+} from a non-mitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature*, 306: 67–69.
- STUMPF, F.; BOXBERGER, M.; THIEME, H.; STRAUSS, O. UND WIEDERHOLT, M. (2001). Flufenamic acid enhances current through maxi-K channels in the trabecular meshwork of the eye. *Curr. Eye Res.*, 22: 427–437.
- TAKEMURA, H.; HUGHES, A.; THASTRUP, O. UND PUTNEY, J., JR (1989). Activation of calcium entry by the tumor promoter thapsigargin in parotid acinar cells. Evidence that an intracellular calcium pool and not an inositol phosphate regulates calcium fluxes at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, 264: 12266–12271.
- TAKEZAWA, R.; CHENG, H.; ISHIKAWA, P.; LAUNAY, P.; KINET, J. P.; FLEIG, A.; YAMADA, T. UND PENNER, R. (2004). A pyrazole derivative, YM483, potently inhibits lymphocyte Ca^{2+} influx and cytokine production by facilitating TRPM4 channel activity. In *Experimental Biology*. Washington, D.C.
- THOMAS, A.; BIRD, G.; HAJNOCZKY, G.; ROBB-GASPERS, L. UND PUTNEY, J., JR (1996). Spatial and temporal aspects of cellular calcium signaling. *FASEB J.*, 10: 1505–1517.
- TSAVALER, L.; SHAPERO, M.; MORKOWSKI, S. UND LAUS, R. (2001). Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins. *Cancer Res.*, 61: 3760–3769.
-

- TSIEN, R.; POZZAN, T. UND RINK, T. (1982). Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *J. Cell Biol.*, 94: 325–334.
- VACA, L.; SINKINS, W.; HU, Y.; KUNZE, D. UND SCHILLING, W. (1994). Activation of recombinant trp by thapsigargin in Sf9 insect cells. *Am. J. Physiol.*, 267: C1501–C1505.
- VARGHESE, A.; TENBROEK, E.; COLES, J. UND SIGG, D. (2005). Endogenous channels in HEK cells and potential roles in HCN ionic current measurements. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* Epub vor Drucklegung.
- WALSETH, T. F. UND LEE, H. C. (1993). Synthesis and characterization of antagonists of cyclic-*adp*-ribose-induced Ca^{2+} release. *Biochim. Biophys. Acta*, 1178: 235–242.
- WANG, W. UND MALCOLM, B. (1999). Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange Site-Directed Mutagenesis. *Biotechniques*, 26: 680–682.
- WEHAGE, E.; EISFELD, J.; HEINER, I.; JUNGLING, E.; ZITT, C. UND LÜCKHOFF, A. (2002). Activation of the cation channel long transient receptor potential channel 2 (LTRPC2) by hydrogen peroxide. A splice variant reveals a mode of activation independent of ADP-ribose. *J. Biol. Chem.*, 277: 23150–23156.
- WELLMAN, G. UND NELSON, M. (2003). Signaling between SR and plasmalemma in smooth muscle: sparks and the activation of Ca^{2+} -sensitive ion channels. *Cell Calcium*, 34: 211–229.
- WILFINGER, W. W.; MACKEY, K. UND CHOMCZYNSKI, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques*, 22: 474–481.
- WULFF, H.; CALABRESI, P.; ALLIE, R.; YUN, S.; PENNINGTON, M.; BEETON, C. UND CHANDY, K. (2003). The voltage-gated $\text{K}_V1.3$ K^+ channel in effector memory T cells as new target for MS. *J. Clin. Invest.*, 111: 1703–1713.
- XIE, G.; RAH, S.; YI, K.; HAN, M.; CHAE, S.; IM, M. UND KIM, U. (2003). Increase of intracellular Ca^{2+} during ischemia/reperfusion injury of heart is mediated by cyclic ADP-ribose. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 307: 713–718.
- XIE, M.; HOLMQVUIST, M. UND HSIA, A. (2004). Ion channel discovery expands into new disease areas. *Curr. Drug Discovery*, 31–33.
- XU, X. Z.; MOEBIUS, F.; GILL, D. L. UND MONTELL, C. (2001). Regulation of melastatin, a trp-related protein, through interaction with a cytoplasmic isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 10692–10697.
-

- YAMADA, A.; GAJA, N.; OHYA, S.; MURAKI, K.; NARITA, H.; OHWADA, T. UND IMAIZUMI, Y. (2001). Usefulness and limitation of DiBAC4(3), a voltage-sensitive fluorescent dye, for the measurement of membrane potentials regulated by recombinant large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels in HEK293 cells. *Jpn. J. Pharmacol.*, 86: 342–350.
- YAMAMOTO, A.; OTSU, H.; YOSHIMORI, T.; MAEDA, N.; MIKOSHIBA, K. UND TASHIRO, Y. (1991). Stacks of flattened smooth endoplasmic reticulum highly enriched in inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP3) receptor in mouse cerebellar Purkinje cells. *Cell. Struct. Funct.*, 16: 419–432.
- YOST, D. UND ANDERSON, B. (1981). Purification and Properties of the soluble NAD glycohydrolase from *Bungarus fasciatus* Venom. *J. Biol. Chem.*, 256: 3647–3653.
- YU, S. UND KERCHNER, G. (1998). Endogenous voltage-gated potassium channels in human embryonic kidney (HEK293) cells. *J. Neurosci. Res.*, 52: 612–617.
- YUDATE, H.; SUWA, M.; IRIE, R.; MATSUI, H.; NISHIKAWA, T.; NAKAMURA, Y.; YAMAGUCHI, D.; PENG, Z.; YAMAMOTO, T.; NAGAI, K.; HAYASHI, K.; OTSUKI, T.; SUGIYAMA, T.; OTA, T.; SUZUKI, Y.; SUGANO, S.; ISOGAI, T. UND MASUHO, Y. (2001). HUNT: launch of a full-length cDNA database from the Helix Research Institute. *Nucleic Acids Res.*, 29: 185–188.
- ZERANGUE, N.; SCHWAPPACH, B.; JAN, Y. UND JAN, L. (1999). A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K_{ATP} channels. *Neuron*, 22: 537–548.
- ZHANG, Y.; HOON, M. A.; CHANDRASHEKAR, J.; MUELLER, K. L.; COOK, B.; WU, D.; ZUKER, C. S. UND RYBA, N. J. (2003). Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell*, 112: 293–301.
- ZHU, X.; JIANG, M. UND BIRNBAUMER, L. (1998). Receptor-activated Ca^{2+} influx via human Trp3 stably expressed in human embryonic kidney (HEK)293 cells. Evidence for a non-capacitative Ca^{2+} entry. *J. Biol. Chem.*, 273: 133–142.
- ZWART, R.; OORTGIESEN, M. UND VIJVERBERG, H. (1995). Differential modulation of $\alpha_3\beta_2$ and $\alpha_3\beta_4$ neuronal nicotinic receptors expressed in *Xenopus* oocytes by flufenamic acid and niflumic acid. *J. Neurosci.*, 15: 2168–2178.
- ZWEIFACH, A. UND LEWIS, R. (1993). Mitogen-regulated Ca^{2+} current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca^{2+} stores. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6295–6299.
-

9 Anhang

9.1 Publikationen

BRANDT, K.; VAN DER BOSCH, J.; **Fliegert, R.** UND GEHRING, S. (2002) TSST-1 induces T_H1 or T_H2 differentiation in naïve $CD4^+$ T cells in a dose- and APC-dependent manner. *Scand. J. Immunol.*, 56:572-579.

GU, X.; YANG, Z.; ZHANG, L.; KUNERTH, S.; **Fliegert, R.**; WEBER, K.; GUSE, A.H. UND ZHANG, L. (2004) Synthesis and biological evaluation of novel membrane-permeant cyclic ADP-ribose mimics: N1-[(5"-O-phosphorylethoxy)methyl]-5'-O-phosphorylinosine 5',5"-cyclicpyrophosphate (cIDPRE) and 8-substituted derivatives. *J. Med. Chem.*, 47:5674-5682.

GASSER, A.; GLASSMEIER, G.; **Fliegert, R.**; LANGHORST, M.F.; MEINKE, S.; HEIN, D.; KRÜGER, S.; WEBER, K.; HEINER, I.; OPPENHEIMER, N.; SCHWARZ, J.R. UND GUSE, A.H. (2005) Activation of T cell calcium influx by the second messenger ADP-ribose. *J. Biol. Chem.*, 281:2489-2496.

9.2 Abstracts und/oder Posterpräsentationen

Fliegert, R.; POTTER, B.V.L.; MAYR, G.W. UND GUSE, A.H. (2001) Evaluation of four novel 8-derivates of cADPR by microinjection and ratiometric Ca^{2+} -imaging. *Meeting of the Scandinavian Physiological Society* in Aarhus/Dänemark vom 26. – 28. Oktober 2001.

Fliegert, R.; MIGAUD, M.; POTTER, B.V.L.; MAYR, G.W. UND GUSE, A.H. (2002) Evaluation of novel 8-substituted analogues of cADPR by microinjection and ratiometric Ca^{2+} -imaging. *Seventh European Symposium on Calcium Binding Proteins in Normal and Transformed Cells* in Brüssel/Belgien vom 12. – 15. Juni 2002.

Fliegert, R.; GENISYUEREK, S.; CORNILS, K. UND GUSE, A.H. (2004) Subcellular localization of TRPM4 isoforms. *25th Symposium at Rauischholzhausen Castle: 'TRP Channels as New Pharmacological Targets'* in Rauischholzhausen vom 10. – 12. Juni 2004. GASSER, A.;

HEINER, I.; LANGHORST, M.F.; **Fliegert, R.**; KRÜGER, S.; LÜCKHOFF, A. GLASSMEIER, G.; SCHWARZ, J R. UND GUSE, A.H. (2004) The TRPM2 agonist ADP-ribose acts as second messenger. *25th Symposium at Rauischholzhausen Castle: 'TRP Channels as New Pharmacological Targets'* in Rauischholzhausen vom 10. – 12. Juni 2004.

GASSER, A.; HEINER, I.; LANGHORST, M.F.; **Fliegert, R.**; KRÜGER, S.; LÜCKHOFF, A. GLASSMEIER, G.; SCHWARZ, J R. UND GUSE, A.H. (2004) The TRPM2 agonist ADP-ribose acts as second messenger. *8th European Symposium on Calcium Binding Proteins in Normal and Transformed Cells* in Cambridge/Großbritannien vom 28. – 31. Juli 2004

Fliegert, R. (2005) Bekanntes und Verwandtes - Immunmodulation durch synthetische Botenstoffe. *2. Hamburger Studententagung zur Medizin- und Biotechnologie* in der Helmut-Schmidt-Universität/Hamburg am 3. Mai 2005.

Fliegert, R.; CORNILS, K.; GENISYUREK, S. UND GUSE, A.H. (2005) Importance of TRPM4 splice variants for modulation of transmembrane potential and Ca²⁺ signalling. *Joint Meeting on 'Chemistry and Biology of Adenine-based Calcium Messengers'* im Universitätsklinikum Eppendorf/Hamburg vom 25. – 27. September 2005.

PARTIDA-SÁNCHEZ, S.; **Fliegert, R.**; GASSER, A.; BHAGAT, H.; WALSETH, T.F.; GUSE, A.H.; LUND, F.E. (2005) ADP-Ribose regulates Calcium influx and chemotaxis via TRPM2 channels in murine neutrophils and dendritic cells. *Keystone Meeting Chemokines and Chemokine Receptors* in Snowbird/USA vom 15. – 20. Januar 2006.

GLASSMEIER, G.; GASSER, A.; **Fliegert, R.**; LANGHORST, M.F.; MEINKE, S.; HEIN, D.; WEBER, K.; OPPENHEIMER, N.; SCHWARZ, J.R. UND GUSE, A.H. (2005) Activation of T Cell Calcium influx through TRPM2 channels by the second messenger ADP-ribose. *Joint Meeting of The German Society of Physiology and The Federation of European Physiological Societies* in München vom 26.-29. März 2006.

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Andreas H. Guse für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung aller technischen und finanziellen Mittel, sowie die kompetenten und zahlreichen Anregungen. Weiterhin möchte ich mich für die motivierende und engagierte Betreuung bedanken.

Herrn Prof. Dr. L. Renwantz danke ich für die Übernahme der Betreuung seitens des Fachbereichs Biologie.

Bei Herrn Prof. Dr. J. R. Schwarz möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, die Patch-clamp-Experimente in seinen Labors durchzuführen. Den Mitarbeitern von Prof. Schwarz sei für die stets freundliche Aufnahme gedankt, insbesondere Herrn Dr. Günter Glassmeier, der mich freundlich und geduldig in die Patch-clamp-Technik eingewiesen und bei der Auswertung der Patch-clamp-Daten unterstützt hat.

Herrn Dr. Tim Walseth (University of Minnesota, Minneapolis, USA) und Frau Dr. Francis Lund (Trudeau Institute, Saranac Lake N.Y., USA) danke ich für die Überlassung des 8-Br-ADPR.

Allen früheren und jetzigen Kollegen, insbesondere Andreas Gasser, Svenja Kunerth, Matthias F. Langhorst und Karin Weber danke ich für die zahlreichen Diskussionen über wissenschaftliche und experimentelle Probleme, die ausgesprochen hilfsbereite und nette Unterstützung und nicht zuletzt für das ausgezeichnete und sehr motivierende Arbeitsklima.
